
Aus der Klinik für Innere Medizin I (Hämatologie/Onkologie)

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Renner

Die Methylthioadenosin-Phosphorylase-Aktivität in humanen hämatopoetischen Stammzellen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

2008

vorgelegt von

Pia Ingrid Hennes, geb. Bergener,

geboren am 09.03.1970 in Pforzheim

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatte:

Meinen Eltern

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
APRT	Adeninphosphoribosyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BFU-E	erythroid Burst forming unit
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-Monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU-E	erythroid colony-forming unit
CFU-GEMM	granulocyte/erythrocyte/macrophage/megacaryocyte colony-forming unit
CFU-GM	granulocyte/monocyte colony-forming unit
DFMO	α -Difluoromethylornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EFA	9-beta-D-Erythrofuranosyladenin
EPO	Erythropoetin
FCS	fetales Kälberserum
GPT	Guanosintriphosphat
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IMP	Inosinmonphosphat
α -KMB	α -Ketomethylthiobutyrat
MTA	Methylthioadenosin
MTAP	Methylthioadenosin-Phosphorylase
MTR-1-P	5'-Methylthioribose-1-Phosphat
mRNA	messenger RNA (Boten Ribonukleinsäure)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung		
PHA-LCM	phytohemagglutinine-stimulated conditioned medium	human	leukocyte
RNA	Ribonukleinsäure		
SAM	S-Adenosylmethionin		

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
	Summary.....	8
2	Einleitung	9
2.1	Methylthioadenosin	9
2.1.1	Biosynthese des Methylthioadenosins	9
2.1.2	Die Rolle des MTA	10
2.2	Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP)	12
2.2.1	Genetik der MTAP	12
2.2.2	Vorkommen von MTAP	12
2.2.3	Klinische Bedeutung der MTAP	13
2.3	Fragestellung	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Chemikalien, Reagenzien und Geräte	15
3.1.1	Cellulose	15
3.1.2	Medien	16
3.1.3	Andere verwendete Substanzen und Chemikalien.....	16
3.1.4	Stammlösungen	19
3.1.5	Geräte	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	Gewinnung von Blutprodukten	22
3.2.2	Aufbereitung der Blutprodukte.....	22
3.2.3	Stammzellkultivierung/Kultivierung der mononukleären Zellen	23
3.2.4	Ansatz der Stammzellkulturen.....	23
3.2.5	Bestimmung der Kolonieart und Koloniefrequenz	25

3.2.6	Durchflusszytometrische Quantifizierung der Stammzellpopulation	26
3.2.7	Zellseparation.....	27
3.2.8	Computerprogramme und Statistik.....	27
4	Ergebnisse	29
4.1	Methoden-Etablierung.....	29
4.1.1	Etablierung serumhaltiger Kulturbedingungen für Stammzellen aus peripherem Blut - Charakterisierung und visuelle Auszählung	29
4.1.2	Ermittlung der optimalen Konzentration von PHA-LCM zur Stimulation von PBMC	30
4.1.3	Einfluss von PHA-LCM auf das Wachstumsverhalten von Knochenmarkstammzellen in Kultur.....	31
4.1.4	Einfluss der Cellulose-Charge auf das Wachstumsverhalten von Knochenmark-Stammzellen in Kultur	33
4.2	Einfluss unterschiedlicher Substrate des Methioninstoffwechsels auf das Wachstumsverhalten von Knochenmarkstammzellen in serumfreier Kultur	34
4.2.1	Einfluss der MTA-Konzentration auf das Wachstumsverhalten von Knochenmark-Stammzellen in serumfreier Kultur	34
4.2.2	Einfluss der MTA-Konzentration auf das Wachstumsverhalten in methioninhaltigen Kulturbedingungen bzw. unter gleichzeitiger Zugabe von Methionin.....	35
4.2.3	Einfluss der α -KMB-Konzentration auf das Wachstumsverhalten von Knochenmark-Stammzellen in serumfreier Kultur	36
4.2.4	Einfluss der Adenin-Konzentration auf das Wachstumsverhalten von Knochenmark-Stammzellen in serumfreier Kultur	38
5	Diskussion.....	40
5.1	MTA-Toxizität in hämatopoetischen Stammzellen	40

5.2	Einfluss von α -KMB - ein Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels	42
5.3	Zugabe von Adenin	44
5.4	MTAP-Aktivität in hämatopoetischen Stammzellen	44
5.5	Bedeutung der Methylthioadenosin-Phosphorylase-Aktivität als Ansatzpunkt einer gezielten Tumorthherapie	45
5.5.1	Hemmung der <i>de novo</i> -Purinsynthese	45
5.5.2	Schutz der MTAP-positiven Zellen	46
5.5.3	Therapeutische Ansätze bei MTAP-negativen Tumorzellen	47
5.5.4	Therapeutische Möglichkeiten von Alanosin	49
6	Literaturverzeichnis	51
7	Danksagung und Publikation	62
8	Lebenslauf	63

1 Zusammenfassung

Das unkontrollierte Wachstumsverhalten ist ein Charakteristikum maligner Zellen. Für die Kontrolle der Proliferation und Differenzierung hat der Methioninstoffwechsel eine zentrale Bedeutung. Die Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) spaltet Methylthioadenosin in Adenin und 5'-Methylthioribose-1-Phosphat. Das Adenin geht in die Nukleotidsynthese ein, 5'-Methylthioribose-1-Phosphat wird über α -Ketomethylthiobutyrat (α -KMB) zu Methionin remethyliert. Da eine MTAP-Defizienz in vielen malignen Zellen gefunden wurde, stellte sich die Frage, ob diese Eigenschaft ein selektives Abtöten von Tumorzellen durch Hemmung der *de novo*-Purinsynthese unter gleichzeitigem Schutz von MTAP-positiven, gesunden Zellen ermöglicht. Der Erhalt hämatopoetischer Stammzellen stellt dabei ein essentielles Ziel einer erfolgreichen Chemotherapie dar. Unter diesem Aspekt ist die Kenntnis des MTAP-Status dieser Zellen von großem Interesse. Die Frage, ob hämatopoetische Stammzellen eine MTAP-Aktivität besitzen, war zentrales Thema dieser Arbeit.

Hierzu wurde der Einfluss unterschiedlicher Substrate des Methioninstoffwechsels in serumfreien - damit methioninfreien - Kulturbedingungen auf das Proliferationsverhalten humaner Knochenmarkstammzellen anhand der Auszählung von Kolonien und Clustern untersucht. Es wurden sowohl unseparierte Knochenmarkstammzellen als auch isolierte CD34-positive Zellen untersucht. Bei der Zugabe von Methylthioadenosin in steigender Dosierung zeigte sich zwar eine Proliferation, aber keine komplette Wiederherstellung der Proliferation im Vergleich zu den methioninhaltigen Kontrollkulturen. In den höheren Konzentrationsbereichen fand sich sogar eine Abnahme der Proliferationsrate. Ein relativ gutes Wachstumsverhalten zeigte sich auch unter methioninfreien Bedingungen nach Zugabe von α -KMB. Demgegenüber ergab die Zugabe von Adenin in unterschiedlicher Konzentration zu methioninfreien Stammzellkulturen - mit α -KMB Zugabe als Methioninquelle - keinen proliferationssteigernden Effekt.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass hämatopoetische Stammzellen eine MTAP-Aktivität besitzen. Dies eröffnet die Möglichkeit einer gezielten

Chemotherapie gegen MTAP-negative Tumorzellen unter Protektion hämatopoetischer Stammzellen.

Summary

An uncontrolled proliferation is a hallmark of malignant tumors. The control of proliferation and differentiation is critically influenced by the metabolism of methionine. Methylthioadenosine-phosphorylase (MTAP) cleaves methylthioadenosine into adenine and 5'-methylthioribose-1-phosphate. Adenine is essential for nucleotide synthesis and 5'-methylthioribose-1-phosphate is remethylated to methionine via α -ketomethylthiobutyrate (α -KMB). A number of malignant cells were shown to be MTAP-deficient. Thus, the use of chemotherapeutic drugs that inhibit de novo synthesis of purines would enable a selective targeting of tumor cells without affecting MTAP-positive non-tumor cells. The preservation of hematopoietic cells is an essential aim of a successful chemotherapy. In this respect, the knowledge of the MTAP-status of these cells is of strong interest. The aim of this study was an analysis of the MTAP-activity of hematopoietic stem cells.

Various substrates of the methionine metabolism under serum-free, methionine-free culture-conditions were analysed towards their effect on the proliferation of human bone marrow-derived stem cells by counting both colonies and clusters. In these experiments both unseparated and CD34-isolated stem cells were used.

Cells proliferated under increasing doses of methylthioadenosine. However, this was less pronounced as compared to control cultures in the presence of methionine. High concentration of methylthioadenosine even resulted in a decrease in proliferation. As with methylthioadenosine, the addition of α -KMB to methionine-free cultures was associated with an increase in proliferation. In contrast, no increase was observed in the presence of adenine in various concentrations to methionine-free cultures with α -KMB as a source of methionine.

In conclusion, hematopoietic stem cells show activity for MTAP. This opens avenues for a targeted chemotherapy of MTAP-negative tumors while protecting hematopoietic stem cells.

2 Einleitung

Fundamentales Merkmal der malignen Zellentartung ist der Kontrollverlust über Proliferation und Differenzierung. Dieses abnorme Wachstumsverhalten maligner Zellen muss letztendlich eine Folge der Veränderung spezifischer metabolischer Wege sein. Im Rahmen der malignen Entwicklung erworbene Defekte im Purin- bzw. Polyamin-Metabolismus scheinen dabei das biologische Verhalten maligner Zellen, ihr malignes Potential und ihr Ansprechen gegenüber einer Chemotherapie wesentlich zu beeinflussen. Erfolgreiche Chemotherapiekonzepte nutzen diesen definierten metabolischen Unterschied zwischen Tumorzellen und normalen Zellen des Körpers aus.

2.1 Methylthioadenosin

Eine entscheidende Rolle in der Proliferation maligner Zellen scheint 3'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) zu spielen (Abb. 1, MTA Stoffwechsel). MTA ist ein natürlich vorkommendes Nukleosid und wurde erstmals zu Beginn des letzten Jahrhunderts beschrieben (MANDEL, DUNHAM, 1912). Die korrekte molekulare Struktur von MTA wurde 12 Jahre später von Suzuki et al. erarbeitet (SUZUKI et al., 1924), ein Jahr nachdem J. H. Müller Methionin isoliert hatte (MUELLER, 1923). Die Arbeitsgruppe um Schlenk wies im weiteren Verlauf nach, dass das Schwefelatom und die Methylgruppe des MTA vom Methionin stammen (SCHLENK, SMITH, 1953). Cantoni entdeckte 1951 S-Adenosyl-L-Methionin und seine Rolle als Methylgruppendonor (CANTONI, 1951).

2.1.1 Biosynthese des Methylthioadenosins

Abb. 1 gibt einen Überblick über die Biosynthese des Methylthioadenosins. Heute ist bekannt, dass MTA während der Biosynthese der Polyamine Spermidin und Spermin stöchiometrisch aus S-Adenosylmethionin (SAM), der aktivierten Form des Methionins, gebildet wird (SCHLENK, 1983). Eine gesteigerte Polyaminsynthese bzw. erhöhte zelluläre Polyaminspiegel finden sich in rasch wachsenden Geweben. MTA wird durch eine spezifische Nukleosid-Phosphorylase – Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) – in 5'-Methylthioribose-1-Phosphat (MTR-1-P) und Adenin gespalten (SCHLENK, 1983)

(Abb. 1). MTR-1-P wird über α -Ketomethylthiobutyrat (α -KMB) zu Methionin verstoffwechselt (BACKLUND et al., 1982). Dieses steht der Zelle wieder als Methylgruppendonator zur Verfügung. Adenin wird durch die Adeninphosphoribosyltransferase (APRT) zu Adenosin-5'-monophosphat (AMP) umgewandelt (BACKLUND, SMITH, 1981). Hierbei stammen bis zu 97% des endogen produzierten Adenins aus dem MTA-Katabolismus (KAMATANI, CARSON, 1981; TISDALE, 1983).

2.1.2 Die Rolle des MTA

MTA inaktiviert die S-Adenosylhomocystein-Hydrolase, hemmt einige S-Adenosylmethionin abhängige Transmethylasen und moduliert so die DNA- und Protein-Methylierung (FERRO et al., 1981). In geringer Konzentration stimuliert MTA über eine Steigerung der Aktivität der Ornithin-Decarboxylase und der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase die Synthese von Putrecin - einer Vorstufe der Polyamine Spermin und Spermidin - und unterdrückt die Sperminsynthese (KAMATANI, CARSON, 1980; KUBOTA et al., 1985). Es verstärkt die Wirkung des α -Difluoromethylornithin (DFMO), eines Inhibitors der Ornithin-Decarboxylase (YAMANAKA et al., 1987). MTA wird über das unspezifische Nukleosid-Transportsystem in die Zelle eingeschleust, daneben besteht eine erhebliche passive Diffusion in die Zelle (STOECKLER, LI, 1987). MTA zeigt zum einen eine agonistische Wirkung am Adenosin-A1-Rezeptor, und zum anderen eine antagonistische Wirkung am Adenosin-A2-Rezeptor (MUNSHI et al., 1988).

MTA beeinflusst viele Reaktionen auf Zellebene wie z.B. Genexpression, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (AVILA et al., 2004). MTA hemmt konzentrationsabhängig, nicht toxisch und reversibel die Proliferation muriner hämatopoetischer Zelllinien und Stammzellen (WOLFORD et al., 1981; WILLIAMS-ASHMAN et al., 1982b; CARSON et al., 1983; SAVARESE et al., 1983b; WOLFORD et al., 1984b), aber nicht deren Differenzierung (RISCOE et al., 1987). Dieser Effekt wird über die Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase vermittelt (RISCOE, FERRO, 1984). Di Fiore et al. (1984) und Shafman (1984) demonstrierten, dass MTA eine mit Dimethylsulfoxid (DMSO) induzierte terminale Differenzierung von Mauserythroleukämie-Zellen verhindert (DI FIORE et al., 1984; SHAFMAN et al., 1984).

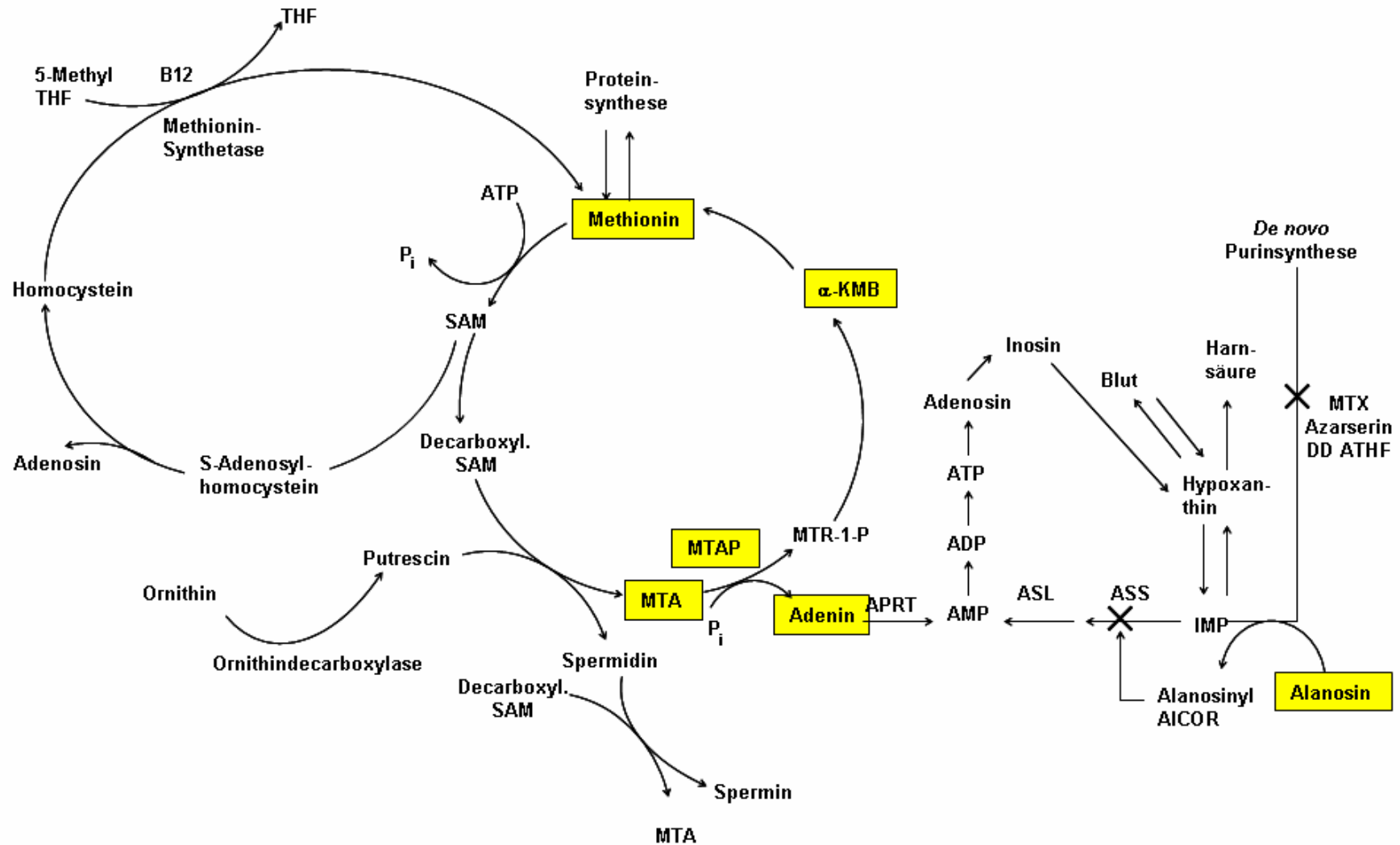


Abb. 1: Methioninstoffwechsel. AMP Adenosinmonophosphat, ADP Adenosindiphosphat, APRT Adeninphosphoribosyltransferase, ATP Adenosintriphosphat, Alanosinyl AICOR L-Alanosinyl-5-Amino-4-Imidazol-Carboxylsäure-Ribonukleotid, ASL Adenosylsuccinatlyase, ASS Adenosylsuccinatsynthase, B12 Vitamin B 12, DDATHF 5,10-Dideazatetrahydrofolsäure (Lometrexol), IMP Inosinmonophosphat, α -KMB α -Ketomethylthiobutyrat MTA Methylthioadenosin, MTAP Methylthioadenosinphosphatase, MTR-1-P 5'-Methylthioribose-1-Phosphat, MTX Methotrexat, SAM S-Adenosylmethionin, THF Tetrahydrofolat,

2.2 Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP)

Eine zentrale Stellung im Stoffwechsel des Methionins und des endogen gewonnenen Adenins stellt die Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) dar. Sie wurde 1969 im Rahmen einer Studie der Spermidin- und Spermin-Synthese in der Prostata der Ratte entdeckt (PEGG, WILLIAMS-ASHMAN, 1969). Hierbei zeigte sich eine strenge Abhängigkeit der Reaktion von dem Vorhandensein von Phosphat. Die Reaktionsprodukte Adenin und 5'-Methylthioribose-1-Phosphat wurden erst 1979 detailliert dargestellt (FERRO et al., 1979). MTAP kann ebenfalls das Chemotherapeutikum 5'-Isobutylthioadenosin (CARTENI-FARINA et al., 1979) sowie 5'-Deoxyadenosin abbauen (PLAGEMANN, WOHLHUETER, 1983).

2.2.1 Genetik der MTAP

Mittels der Analyse somatischer Zellhybride ließ sich das menschliche Gen für MTAP auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 (*9pter-q12*) lokalisieren (CARRERA et al., 1984). Es liegt in enger Nachbarschaft der Gen-Cluster der Interferone $\alpha 1$ und $\beta 1$. Eine mögliche Rolle der Interferone oder des *MTAP*-Gens als Tumorsuppressorgen bei lymphoblastischen Leukämien wurde diskutiert (DIAZ et al., 1988; OLOPADE et al., 1995). Die Arbeitsgruppe um Kamb konnte die Genregion näher lokalisieren und entdeckte, dass die Gene *p16/MTS-1* und *p15/MTS-2* - Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 (Tumorsuppressoraktivität) - ebenfalls in der betroffenen Region liegen (KAMB et al., 1994). Ferner wurden Kodeletionen der Gene *p16/MTS-1*, *MTAP*, *Interferon $\alpha 1$* , *Interferon $\beta 1$* und anderer auf *9p12* lokalisierter Marker in menschlichen malignen Zelllinien gefunden (ZHANG et al., 1996).

2.2.2 Vorkommen von MTAP

MTAP wurde bisher in allen normalen Säugetiergeweben und in Zelllinien, die aus normalem Gewebe entwickelt wurden (WILLIAMS-ASHMAN et al., 1982a), sowie in Insektengeweben (SHUGART et al., 1979), Bakterien und Protozoen (SHIMIZU et al., 1986; MILLER et al., 1987) nachgewiesen. In malignen Zelllinien und in

Zellen akuter lymphoblastischer und myeloischer Leukämien, maligner Lymphome und solider Tumoren (Gliome, Lungenkarzinome, Osteosarkome) fehlt dagegen häufig eine MTAP-Aktivität (KREIS et al., 1980; KAMATANI, CARSON, 1981; KANO et al., 1982; FITCHEN et al., 1986; TRAWEEK et al., 1988; NOBORI et al., 1991; DELLA RAGIONE et al., 1992; NOBORI et al., 1993). Dementsprechend scheiden Patienten mit MTAP-negativen Lymphomen höhere Mengen von MTA im Urin aus (KANEKO et al., 1984; KANEKO et al., 1990).

2.2.3 Klinische Bedeutung der MTAP

Ein gestörter MTA-Katabolismus scheint nach diesen Befunden eine spezifische Abnormalität zu sein, die einige maligne Zellen von benignen unterscheidet. Eine therapeutische Nutzung dieses metabolischen Unterschiedes wurde schon frühzeitig von Kamatani et al. (KAMATANI et al., 1981) diskutiert. Dabei ist die Ursache dieser MTAP-Defizienz noch weitgehend unklar. Es wird angenommen, dass Störungen auf genomischer Ebene die spezifische mRNA-Biosynthese behindern und so zum Enzymdefekt in den untersuchten MTAP-defizienten Zelllinien führen (DELLA RAGIONE et al., 1992).

2.2.3.1 MTAP-Defizienz und eventuelle Therapiemöglichkeiten

Die MTAP-Defizienz von bestimmten malignen Zellen bietet eine einzigartige Möglichkeit für die Entwicklung einer Therapie, die selektiv die betroffenen Zellen angreift und die gesunden verschont. Eine solche Therapie ist über die Hemmung der *de novo*-Synthese von AMP vorstellbar. MTAP-negative (maligne) Zellen gehen zugrunde, da die Adeningewinnung über MTA bei fehlender MTAP-Aktivität nicht möglich ist. Gesunde Zellen hingegen können durch ihre intakte MTAP-Aktivität weiterhin Adenin sourcieren. Ein potenter Inhibitor der AMP-*de novo*-Synthese ist L-Alanosinyl-5-Amino-4-Imidazo-Carboxylsäure-Ribonukleotid (L-Alanosin). L-Alanosin agiert als starker Inhibitor der Adenosylsuccinat-Synthase, die Inosinmonophosphat (IMP) in AMP überführt.

2.3 Fragestellung

Etwa 98% der Zellen des menschlichen Knochenmarks wurden mit Hilfe autoradiographischer Methoden als MTAP-positiv identifiziert (KAMATANI et al.,

1981). Primitive hämatopoetische Vorläuferzellen repräsentieren jedoch nur eine kleine Fraktion (ca. 0,01%) normaler Knochenmarkzellpräparationen (METCALF, 1989), so dass aus methodischen Gründen der Enzymstatus hämatopoetischer Stammzellen bisher unklar war.

Da sich eine fehlende MTAP-Aktivität außer in malignen Lymphomen und soliden Tumoren auch in Zellen akuter lymphatischer und myeloischer Leukämien fand, kann daher angenommen werden, dass der Defekt bereits in der frühen Differenzierung liegt. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob bei normalen, nicht entarteten hämatopoetischen Stammzellen eine MTAP-Defizienz vorliegt. Die Kenntnis des Enzymstatus könnte den gezielten Einsatz von Chemotherapeutika ermöglichen. Daher wurde in dieser Arbeit die MTAP-Aktivität von hämatopoetischen Stammzellen untersucht. Es wurden serumfreie und somit methioninfreie Kulturbedingungen erarbeitet und unter Zusatz von Substraten des Methioninstoffwechsels (MTA, α -KMB, Adenin und Methionin) Stammzellkulturen angelegt. Die Evaluation der MTAP-Aktivität erfolgte über die Bestimmung der Proliferation sowie durch Charakterisierung und Quantifizierung von Kolonieformierenden Einheiten.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Reagenzien und Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Geräte sind nachfolgend aufgelistet.

3.1.1 Cellulose

Aldrich-Cellulose

Methylcellulose
Viskosität 4000 cP
2%ige Lösung in Wasser
Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
27,441-0

Fertigmedium

Methocult
Complete Ready Mix with 5%
serum-containing PHA-LCM
Terry Fox Labs, Vancouver, BC,
Kanada
#HCC-4433

Fluka-Cellulose

Methocel MC; USP; high viscosity
Methoxyl content 27,5-32%
Viskosität 3000-5000 mPa
2%ige Lösung in Wasser
Fluka Biochemica, Seelze,
Deutschland
64630

ICN-Cellulose

Methyl-Cellulose
Viscosity of 2% Solution
IS 4,000 CPS
ICN, Solon, OH, U.S.A.
55515

Terry-Fox-Cellulose	HCC-4100 Metho Cult H 4100 Basic Stock Solution Terry Fox Labs, Vancouver, BC, Kanada
---------------------	---

3.1.2 Medien

IMDM	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (1X) liquid # 21980
IMDM-M	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland in doppelter Konzentration ohne Methionin (Kundenrezeptur)
IMDM	double strength Pulver (zum Kochen der Methioninhaltigen Cellulose) GIBCO, Karlsruhe, Deutschland w/o Supplements w/L-Glutamin w/o NaHCO ₃ # 074-02200A
RPMI	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland # 21875

3.1.3 Andere verwendete Substanzen und Chemikalien

Adenine	6-Aminopurine, Cell Culture Grade, Approx. 99% Sigma, Deisenhofen, Deutschland A-2786 Lot 10H77025
α -KMB	α -Keto-Methylthiobutyrat, Natriumsalz (C ₅ H ₇ O ₃ SNa) Sigma, Deisenhofen, Deutschland # K-6000

CD34-Antikörper	CD34 (Anti-HPCA-2) Isotype IgG1, Clone 8G12 Becton Dickinson, San Jose, CA USA # 348050
Aqua dest.	Aqua pro injectione salvia steril und pyrogenfrei pH-Wert = 5,3 - 7,0 Clintec/Salvia, Homburg, Deutschland
Beads	Dynabeads M450, coated with Goat anti-Mouse IgG Dynal, Oslo, Norwegen # 110.05 2 ml ~ 4×10^8 beads/ml
BSA	bovines Serumalbumin, Fraction V, Crystalline Calbiochem, Darmstadt, Deutschland # 12657
Cholesterol	5-6 Cholesten-3 β -ol Sigma, Deisenhofen, Deutschland # C7402
Erythropoetin (EPO)	NeoRecormon Hoffmann La Roche, Grenzach, Deutschland 1U/ μ l
FCS	Fetales Kälberserum GIBCO, Karlsruhe, Deutschland # 011-06290 M hitzeinaktiviert bei 56°C
FICOLL	Lymphozyten Separationsmedium, Dichte 1,077 g/ml, steril Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland # 295 949
L-Glutamin 200 mM	100X

	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland # 25030-024
Heparin	25.000 I.E. / 5 ml Novo Nordisk, Mainz, Deutschland
Insulin	ca. 24,5 U per mg, aus bovinem Pankreas Sigma, Deisenhofen, Deutschland # 6634
2-Mercaptoethanol	50 MM GIBCO, Karlsruhe, Deutschland # 043-01350
MTA	5'-deoxy-5'-Methyl-Thioadenosine Desiccate $C_{11}H_{15}N_5O_3$ Sigma, Deisenhofen, Deutschland # D-5011
Methionin	α -Methionine (100X), lyophilisiert GIBCO, Karlsruhe, Deutschland # 300-2408B
Natriumbicarbonat 7,5%	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland, # 043-05080D
PBS	Gepufferte sterilisierte Kochsalzlösung nach Dulbecco pH 7,2 ohne $MgCl_2$ und $CaCl_2$
PHA-LCM	Hemostim H2450, PHA-konditioniertes Medium für humane Leukozyten ohne FCS Terry Fox Labs, Vancouver, BC, Kanada # HCC-2450
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin (100X) (10000 IU/ml)

	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland # 04305140
Transferrin	Holo-Transferrin (Siderophilin, iron-saturated), human, ca. 98% Sigma, Deisenhofen, Deutschland # T-4778
Türk's Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland #8370

3.1.4 Stammlösungen

Stammlösung von Adenin, 1 mM in PBS

Eine 1 mM Lösung wird mit 135,1 mg Adenin (Molekulargewicht 135,1 g/mol) in 1 l PBS angesetzt. Aus dieser Stammlösung werden die benötigten Konzentrationen (5, 25, 50, 100 μ M) gewonnen.

Stammlösung von α -KMB, 10 mM in IMDM (M+/M-)

Eine 10 mM Lösung wird mit 16 mg α -KMB (Molekulargewicht 170,2 g/mol) in 9,4 ml IMDM (M+/M-) angesetzt. Aus dieser Stammlösung werden die benötigten Konzentrationen (25, 50, 100, 150, 200 μ M) gewonnen.

BSA-Stammlösung 10%

Für die Stammlösung wird 1 g BSA in 10 ml IMDM (M+/M-) angesetzt und bei 4°C gelagert. Hiervon werden 100 μ l auf 1 ml Medium gegeben. Endkonzentration: 1%

Cholesterol-Stammlösung

Für die Stammlösung werden 12 mg Cholesterolpulver in 1 ml Ethanol über einem 50°C warmen Wasserbad gelöst. Anschließend im Verhältnis von 1:10 mit Ethanol verdünnt. Lagerung der Stammlösung bei 4°C. Hiervon werden 5 μ l auf 1 ml Medium gegeben. Endkonzentration: 6 μ g/ml.

L-Glutamin-Stammlösung 1%

5 ml Glutamin werden mit 500 ml IMDM (M+/M-) gemischt. Lagerung bei -20°C. Hiervon wurden 10 µl auf 1 ml Medium gegeben. Endkonzentration: 0,01%.

Insulin-Stammlösung 100 µg/ml

Für die Stammlösung werden 10 mg Pulver im 5 ml NaCl gelöst und zusätzlich mit 50 µl 100%-iger Essigsäure versetzt. Diese wird dann im Verhältnis von 1:20 Verdünnt, d.h. 100 µl der Stammlösung enthalten 10 µg Insulin (0,01%). Hiervon werden 100 µl auf 1 ml Medium gegeben. Endkonzentration: 0,001%.

Mercaptoethanol-Stammlösung 10 mM

Die Mercaptoethanol-Lösung 50 mM wird 1:5 verdünnt. Hiervon werden 10 µl pro ml Medium verwendet, Endkonzentration: 100 µM.

Methionin-Stammlösung 0,15% (1,5 mg/ml)

15,0 mg werden in 10 ml sterilem, deionisiertem Wasser gelöst. Endlösung 30 µg/ml.

Stammlösung von MTA, 1 mM in deionisiertem Wasser

Eine 1 mM Lösung wird mit 29,73 mg MTA (Molekulargewicht 297,3 g/l) in 100 ml sterilem, deionisiertem Wasser gelöst. Aus dieser Stammlösung werden die benötigten Konzentrationen (5, 25, 50, 100 µM) gewonnen.

Transferrin-Stammlösung 0,3%

Es werden 3 mg Transferrin in 1 ml IMDM (M+/M-) gelöst.

Heparinlösung

1 ml Lösung enthält 5000 I.E. Natrium-Heparin.

Transferrin-Stammlösung (0,3%)

Es werden 3 mg Transferrin in 1 ml IMDM (M+/M-) gelöst. Hiervon werden 100 µl auf 1 ml Medium gegeben, Endkonzentration: 0,03%.

Natriumbicarbonat 7,5% (Fertiglösung)

Es werden 10 µl auf 1 ml Medium gegeben, Endkonzentration 0,075%.

3.1.5 Geräte

1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim
15 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Brutschrank	Heraeus, Hamburg
Durchflusszytometer (FACScan)	BD Biosciences, Heidelberg
Einmal-Plastikpipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Corning Costar, Bodenheim
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Kolbenhubpipetten (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten (4-Wellplatten)	Greiner, Frickenhausen
Mikroskop	Zeiss, Jena
Neubauer Zählkammer	Marienberg
Parafilm	Greiner, Frickenhausen
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Greiner, Frickenhausen
Sterile Werkbank, Tecnoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Vortex-Mixer, (Reagenzglas mixer)	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge, Megafuge	Heraeus, Hanau

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung von Blutprodukten

Das periphere Blut wurde mittels Venenpunktion gewonnen. Das Knochenmark wurde freundlicherweise von der hiesigen orthopädischen Klinik zur Verfügung gestellt. Dieses wurde im Rahmen von Implantationen von künstlichen Hüftgelenken als überschüssiges Knochenmark gewonnen. Der Transport der gewonnen Blutprodukte erfolgte in mit Heparin versetztem PBS (für drei 50 ml Röhrchen wurden 20 ml PBS mit 5 ml (25000 I.E.) Heparin vermischt und zu gleichen Teilen aufgeteilt).

3.2.2 Aufbereitung der Blutprodukte

Mittels eines Rührers (Vortex) wird das mit dem PBS-Heparin-Gemisch verdünnte Knochenmark gut vermischt, um anschließend mit Hilfe einer 10 ml Pipette möglichst viel Knochenmark zu entnehmen. Der verbleibende Rest wird mit PBS aufgefüllt, vermischt und das Knochenmark erneut mit der Pipette entnommen. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis das Knochenmark ausgewaschen ist. Das Material wird in zwei 50 ml Röhrchen verteilt und 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wird der Zentrifugationsschritt abhängig von der Klarheit des Überstandes ggf. wiederholt. Das entstandene Pellet wird mit 10 ml PBS aufgefüllt und eine Auftrennung der Leukozytenpopulationen durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll durchgeführt. Hierfür werden jeweils 4 ml Ficoll-Lösung in zwei 15 ml Röhrchen gefüllt. Die in PBS resuspendierten Knochenmarkszellen werden vorsichtig über die Ficoll-Lösung überschichtet. Anschließend werden die Röhrchen für die Dauer von 20 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der dabei entstehende wässrige Überstand wird vorsichtig abgesaugt. Die zellreiche Interphase wird entnommen, in 50 ml Röhrchen überführt und das Zellpellet zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die so gewonnenen mononukleären Zellen in einer Kulturflasche mit 25 ml IMDM/FCS 10 % über Nacht unter Standardbedingungen liegend in einem Brutschrank (37°C, 7,5 % CO₂) inkubiert.

Bei initial stark verklumptem Knochenmark werden pro 8-10 ml Knochenmark 800 U Collagenase hinzugegeben und für 2-4 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert, um anschließend das Knochenmark wie oben beschrieben aufzubereiten.

Das nach peripherer Venenpunktion gewonnene Blut wird analog dem Knochenmark aufbereitet. Das initiale Spülen, das beim Knochenmark notwendig ist, entfällt.

3.2.3 Stammzellkultivierung/Kultivierung der mononukleären Zellen

Nach der oben beschriebenen Aufbereitung und initialen Kultivierung des Knochenmarkes bzw. des peripheren Blutes erfolgt am darauffolgenden Tag zunächst das Lösen der adhärennten Zellen durch wiederholtes vorsichtiges Spülen mit Medium (IMDM). Danach wird die gesamte Zellsuspension einer erneuten Ficoll-Trennung zugeführt. Daraufhin erfolgt die Zellzählung mittels Zählkammer (nach Neubauer). Hierfür werden 50 µl der Zellsuspension mit 950 µl Türk's Reagenz (Verdünnung 1:20) sorgfältig gemischt und 10 µl dieser Mischung mittels Eppendorfpipette in die mit einem Deckglas abgedeckte Zählkammer gegeben. Die Zellen aus 4 Quadranten (entsprechend 0,4 µl) werden unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro 1 ml Gesamtvolumen errechnet sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl/1 ml} = \text{Zellzahl aus 4 Quadranten} \times 2,5 \times 20 \times 1000 \mu\text{l}$$

Anschließend werden die Zellen in Abhängigkeit des Versuches auf eine Zellzahl von $5 \times 10^5/\text{ml}$ bis $4 \times 10^6/\text{ml}$ bzw. $6 \times 10^6/\text{ml}$ durch Zugabe von PBS eingestellt.

3.2.4 Ansatz der Stammzellkulturen

Die unter 3.2.3 gewonnenen mononukleären Zellen werden zur Erfassung und Charakterisierung der Stammzellen in entsprechende Kulturgefäße überführt und mit verschiedenen Substraten versetzt.

Basissubstanz sämtlicher Kulturen ist eine 1,6 % Celluloselösung (w/v). Diese wird gemäß Standardrezept nach Abwiegen von 1,6 g Methocel-Pulver und Vorsterilisation über 1 h unter UV-Licht in 50 ml destilliertem kochenden Wasser eingebracht und nach zweiminütigem kräftigen Schütteln für weitere zwei Minuten

ohne Blasenbildung gekocht. Anschließend wird diese Cellusolösung fünf Minuten gut geschüttelt und nach Abkühlung auf ca. 40°C wird 50 ml eiskaltes double-strength IMDM (methioninhaltig oder methioninfrei) zugesetzt. Danach wird die Lösung mit einem Parafilm verschlossen und über Nacht im Kühlschrank mit einem Magneten gerührt. Am nächsten Tag wird die für die serumfreien Kulturansätze mit methioninfreiem IMDM hergestellte Cellulose portionsweise zu 0,5 ml bei -20°C eingefroren.

3.2.4.1 Grundrezept der serumhaltigen Kulturansätze

Bei der initialen Optimierung der Kulturbedingungen werden Cellulosepräparate verschiedener Hersteller ausgetestet. Für die serumhaltigen Ansätze werden selbst hergestellte Cellulosen sowie die Fertigcellulose Terry-Fox verwendet. Die selbst hergestellte Cellulose der unterschiedlichen Hersteller wird für die serumhaltigen Ansätze nicht zu 0,5 ml Portionen eingefroren sondern zuvor wie im weiteren beschrieben weiterverarbeitet: zu 5 ml Cellulose (1,6 %) werden 3 ml FCS, 1 ml BSA 10 %, 0,5 ml PHA-LCM, 0,3 ml Iscove's, 0,1 ml L-Glutamin 200 mM, 0,1 ml Mercaptoethanol (10^{-2} M) und 30 μ l Erythropoetin (1 U/ μ l) zu einem Gesamtvolumen von 10 ml gemischt. Bei Einsatz von Fertigcellulose wird ein anderes Mischungsverhältnis gewählt. Dabei werden 4 ml Cellulose (2,3 %) mit 1,3 ml Iscove's unter Beibehaltung des Gesamtvolumens und der sonstigen Reagenzien vermischt. Nach Fertigstellung der jeweiligen Cellulosemischungen werden diese zu 1 ml Portionen bei -20°C eingefroren. Für die Versuchsansätze werden 25 μ l Zellsuspension hinzugefügt. Ferner wird diesen Ansätzen 10 μ l Natrium-Bikarbonat 7,5 % beigegeben.

3.2.4.2 Grundrezept der serumfreien Kulturansätze

Als weiteres werden der aufgetauten methioninfreien Cellulose für die einzelnen Versuchsreihen Wachstumsfaktoren bzw. wachstumsfördernde Faktoren wie folgt hinzugefügt: EPO 3 μ l (= 3 U), 10 μ g Insulin, 100 μ l BSA 10 %, 6 μ g Cholesterol, 100 μ l (= 300 μ g) Transferrin, 10 μ l L-Glutamin (200 mM), 10 μ l Mercaptoethanol (10^{-2} M). Ferner werden 25 μ l Zellsuspension dazugegeben. Um ein Gesamtvolumen von 1 ml zu erhalten, wird die Differenz hierzu mit methioninfreiem IMDM aufgefüllt. Ebenso werden die Lagerlösungen für die serumfreien und somit methioninfreien Ansätze mit methioninfreiem IMDM angesetzt.

3.2.4.2.1 Ansätze zur Evaluierung der PHA-LCM-Konzentration

Um die optimale Konzentration von PHA-LCM herauszufinden, wird der oben beschriebenen Grundrezeptur PHA-LCM unterschiedlicher Konzentrationen (0, 2,5, 5 und 7,5%) hinzugefügt.

3.2.4.2.2 Modifikation der Versuchsreihen durch Zugabe von Substraten

Nach Festlegung der PHA-LCM-Konzentration wird 100 µl MTA-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 25, 50, 100 µM) zugesetzt. Desweiteren wird den Ansätzen mit den verschiedenen MTA-Konzentrationen 20 µl Methionin (1,5 mg/ml) zugesetzt. Ferner wird serumhaltigen Kulturen MTA in den gleichen Konzentrationen wie in den serumfreien Kulturen zugesetzt.

In einem weiteren Versuchsansatz wird den serum-/methioninfreien Kulturen 50 µl α-KMB-Lösung in verschiedenen Konzentrationen (25, 50, 100, 150 bis 200 µM) zugegeben. Parallel erfolgt die Titration der Adeninkonzentration durch Zugabe von 50 µl Adenin-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (5, 25, 50, 100 µM).

Die Zellkulturen werden in 4-well-multidish-Platten angelegt. In jede Vertiefung werden 250 µl des Gesamtvolumens von 1 ml pipettiert. Die Zwischenräume werden zum Verhindern des Austrocknens der Zellsuspension mit aqua dest. ausgefüllt.

Die Zellzahl pro well wird abhängig von der initial gewonnen Zellzahl auf 1000 - 25000 Zellen/well eingestellt. Bei Versuchsreihen mit unseparierten Zellen wird die Zellzahl auf 25000 Zellen/well eingestellt, bei separierten Ansätzen (nach Isolation CD34 positiver Zellen, s. 3.2.7) werden 1000 Zellen/well gewählt.

Die Stammzellkulturen werden unter Standardbedingungen bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 7,5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.2.5 Bestimmung der Kolonieart und Koloniefrequenz

Die Auszählung der Stammzellkolonien erfolgt visuell am 7. und 14. Tage unter Zuhilfenahme eines Invertmikroskopes (Zeiss, Jena).

Gemäß Definition erfolgt die Unterscheidung in Cluster (Zellhaufen von ca. 8-20 Zellen) und Kolonien (s. auch Abb. 2, S. 30). Aufgrund der Farbe und der

Wachstumscharakteristika werden die Kolonien in CFU-GEMM (orange), CFU-GM (weiß), CFU-E (rot) unterschieden. Die gemischten CFU-GEMM Kolonien enthalten mehr als 20 % durchsichtige sowie mehr als 20% hämoglobinhaltige Zellen. Die CFU-GM zeichnen sich durch mehr als 80 % durchsichtige Zellen aus und im Gegensatz dazu die CFU-E durch mehr als 80 % hämoglobinhaltige Zellen. Ebenso werden weiße und rote (BFU-E) Cluster unterschieden. Beim Auszählen der Ansätze werden zwar die unterschiedlichen Cluster- und Kolonieformen differenziert, in die Bewertung gehen jedoch lediglich die Gesamtzahlen der Cluster bzw. Kolonien ein.

3.2.6 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Stammzellpopulation

Die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie erlaubt eine objektive Bestimmung der Fluoreszenzintensität und korreliert damit zu der pro Zelle gemessenen Expressionsdichte eines Oberflächenmoleküls. Neben ihrer objektiven Messmethode hat diese Technik den Vorteil, dass die Analyse auf vitale Zellen und deren Expression eines Moleküls hin beschränkt werden kann. Fixierungsartefakte werden so vermieden.

Durch einen Argon-Laser lassen sich die zur Zellmarkierung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe der Sekundärantikörper bei 488 nm anregen. Die spezifischen Emissionssignale werden mittels Fotodetektoren und ihnen vorgeschalteter Filter gemessen, wobei diese nur den für jeden Farbstoff charakteristischen Anteil seines Emissionsspektrums passieren lassen. Dieser charakteristische Teil liegt für Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bei 530 nm und für Phycoerythrin (PE) bei 585 nm. Das detektierte Signal wird über vier Dekaden logarithmisch verstärkt.

Zur Markierung der Stammzellen werden 1×10^6 Zellen in 100 µl PBS mit 10 µl FITC-markierten Anti-CD34 Antikörper für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal in PBS-Puffer gewaschen und mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACScan, BD, Heidelberg, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers analysiert.

3.2.7 Zellseparation

Eine physikalische Trennung bzw. eine Anreicherung CD34-positiver Stammzellen erfolgt durch Zugabe von Magnetpartikel-markierten Antikörpern. Hierzu werden 10 µl unmarkierter Anti-CD34-Antikörper (BD, Heidelberg) mit der Ausgangszellsuspension 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Anteil ungebundenen Antikörpers durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und 10 µl eines mit einem Magnetpartikel konjugierten sekundären Antikörpers (Dynabead M 450, Goat-anti-mouse Antikörper) zu 100 µl Zellsuspension gegeben. Erneut erfolgt eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis mit nachfolgendem Waschen in PBS. Zur Abtrennung der nun Magnetpartikel-markierten Stammzellen wird das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 5 ml Röhrchen überführt. Durch Anbringen eines Magnetfeldes lagern sich die Antikörper-markierten Zellen der Wand des Röhrchens an und der unmarkierte Anteil kann dekantiert und durch mehrmaliges vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt werden. Anschließend wird das Röhrchen aus dem Magnetfeld genommen und die angereicherte Stammzellpopulation in 500 µl PBS resuspendiert.

3.2.8 Computerprogramme und Statistik

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die in Tab. 1 aufgelisteten Computerprogramme verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Prism v4.01 der Firma Graphpad, San Diego, Kalifornien. Der dosisabhängige Einfluss verschiedener Substrate auf die Kolonie- und Clusterbildung wurde mittels nicht-parametrischem, gepaartem Friedman Test und Dunn's Post-Test ermittelt. Sofern nicht anders bezeichnet, sind Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Tab. 1: Computerprogramme, die im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurden.

Programm	Anwendung
Lysis II	Messung und Auswertung durchflussszytometrischer Daten

Programm	Anwendung
Microsoft Excel	Datenverarbeitung
Graphpad Prism 4.01	Grafik und Statistik
Microsoft Word	Textverarbeitung

4 Ergebnisse

4.1 Methoden-Etablierung

4.1.1 Etablierung serumhaltiger Kulturbedingungen für Stammzellen aus peripherem Blut - Charakterisierung und visuelle Auszählung

Initial erfolgte die Anlage von serumhaltigen Kulturen mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), um die Erstellung der Kulturbedingungen sowie die Charakterisierung und visuelle Auszählung von sowohl Clustern als auch Kolonien zu erlernen. Abb. 2 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von Clustern (Abb. 2A) sowie weißen und roten Kolonien (Abb. 2B). Zunächst wurde eine selbst hergestellte serumhaltige Cellulose-Charge (1,6 %) verwendet, der der Wachstumsfaktor Erythropoetin (3U/ml) hinzugefügt wurde. Desweiteren wurde eine kommerziell erhältliche Cellulose-Charge benutzt, die 5 % eines zellstimulierenden Lektins PHA-LCM enthielt (Fertigmedium, serumhaltig).

Erwartungsgemäß zeigte sich eine deutlich gesteigerte Anzahl von Clustern nach der Zugabe von Erythropoetin (Abb. 2C). In der kommerziellen Cellulose, die sowohl serum- als auch PHA-LCM-haltig war, konnten deutlich höhere Zahlen an Clustern und Kolonien ausgezählt werden (Abb. 2B und C). Dieser Versuchsansatz diente vorrangig zum Erlernen des experimentellen Ansatzes und die Auszählung der Cluster und Kolonien erfolgte nur einmalig am 11. Tag.

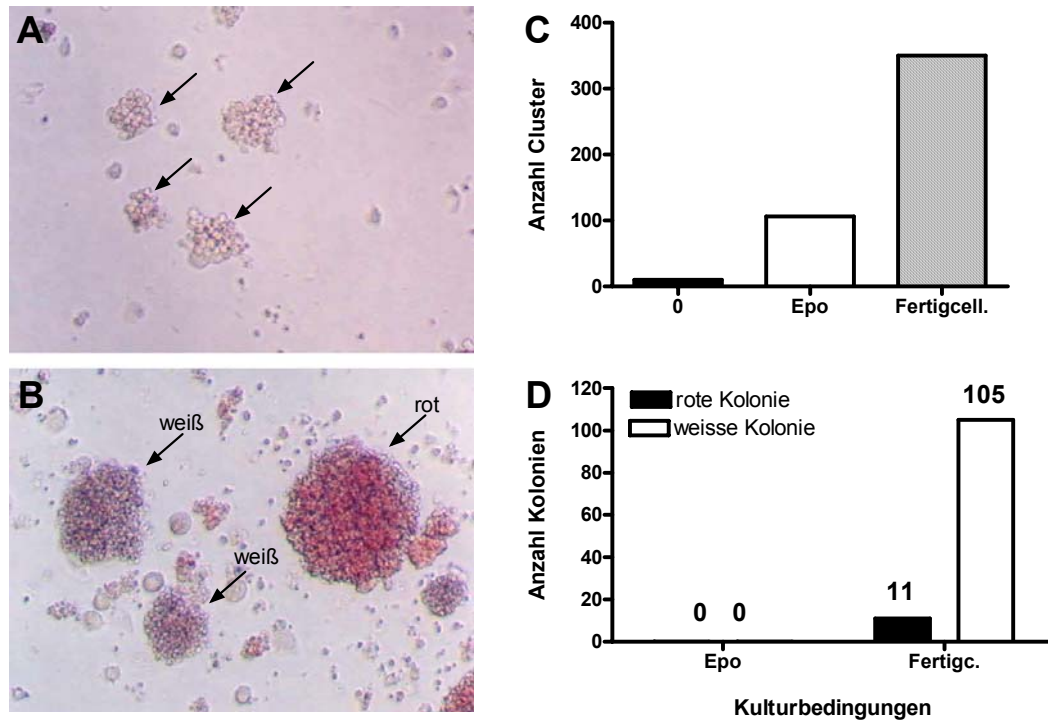


Abbildung 2: Einfluss von Wachstumsfaktoren bzw. Cellulosechargen auf die Anzahl von Clustern und Kolonien. Lichtmikroskopische Aufnahme von **A** Clustern und **B** weißen und roten Kolonien (s. Pfeile). **C** Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden isoliert und in einem Cellulose-haltigen Medium („0“), einer Cellulose mit Erythropoetin (Epo, 3 U/ml) und in einer kommerziell erhältlichen PHA-LCM haltigen Fertigcellulose inkubiert. Die Auszählung von Clustern erfolgte nach 11 Tagen. Es wurde der Ansatz von einem Patienten ausgewertet. **D** Einfluss von Wachstumsfaktoren bzw. Cellulosechargen auf die Anzahl von Kolonien. PBMC wurden isoliert und in einer Cellulose mit Erythropoetin (3 U/ml) oder einer kommerziell erhältlichen PHA-LCM haltigen Fertigcellulose inkubiert. Die Auszählung von Kolonien erfolgte nach 11 Tagen. Koloniezahlen sind über den entsprechenden Säulen angegeben. Es wurde der Ansatz von einem Patienten ausgewertet.

4.1.2 Ermittlung der optimalen Konzentration von PHA-LCM zur Stimulation von PBMC

Im weiteren Verlauf erfolgte die Etablierung der serumfreien Kulturbedingungen von PBMC mit Austestung von unterschiedlichen Konzentrationen des Wachstumsfaktors PHA-LCM (0 bis 7,5%), allerdings zunächst ohne Anlage einer serumhaltigen Kontrollkultur. Die Anzahl der hierdurch induzierten PBMC-Cluster zeigte große Schwankungen (Abb. 3A), während die höchsten

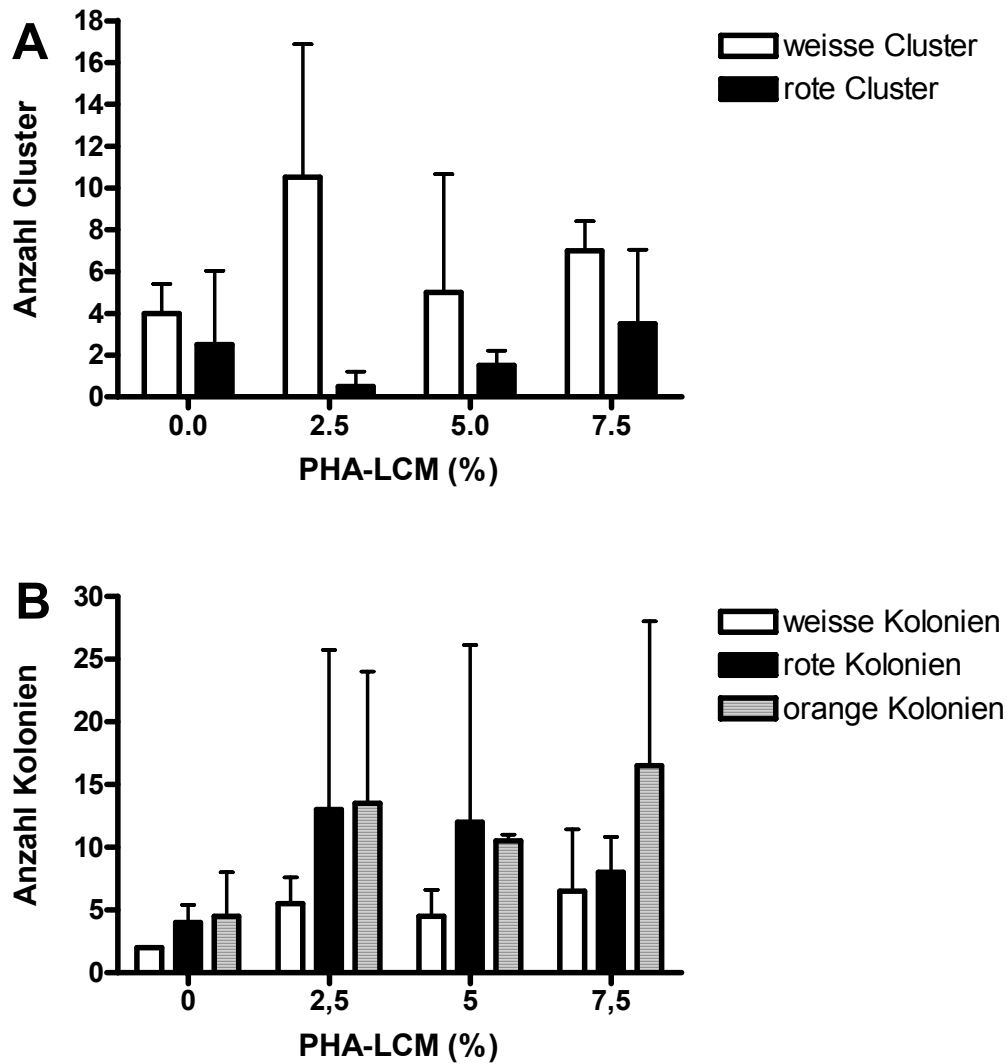


Abbildung 3: Einfluss der PHA-LCM-Konzentration (0 – 7,5%) auf die Ausbildung von **A** Clustern und **B** Kolonien von PBMC. Insgesamt wurden Ansätze von 2 Patienten ausgewertet. Die Auszählung erfolgte am Tag 14.

Gesamtkoloniezahlen bei 2,5 % bzw. 7,5 % PHA-LCM beobachtet werden konnten (Abb. 3B).

4.1.3 Einfluss von PHA-LCM auf das Wachstumsverhalten von Knochenmarkstammzellen in Kultur

Im Folgenden wurde der Einfluss von PHA-LCM auf serumfreie Knochenmarkstammzellkulturen untersucht. Es wurden hier zunächst Kulturen von angereicherten CD34 positiven Stammzellen nach Magnet-vermittelter

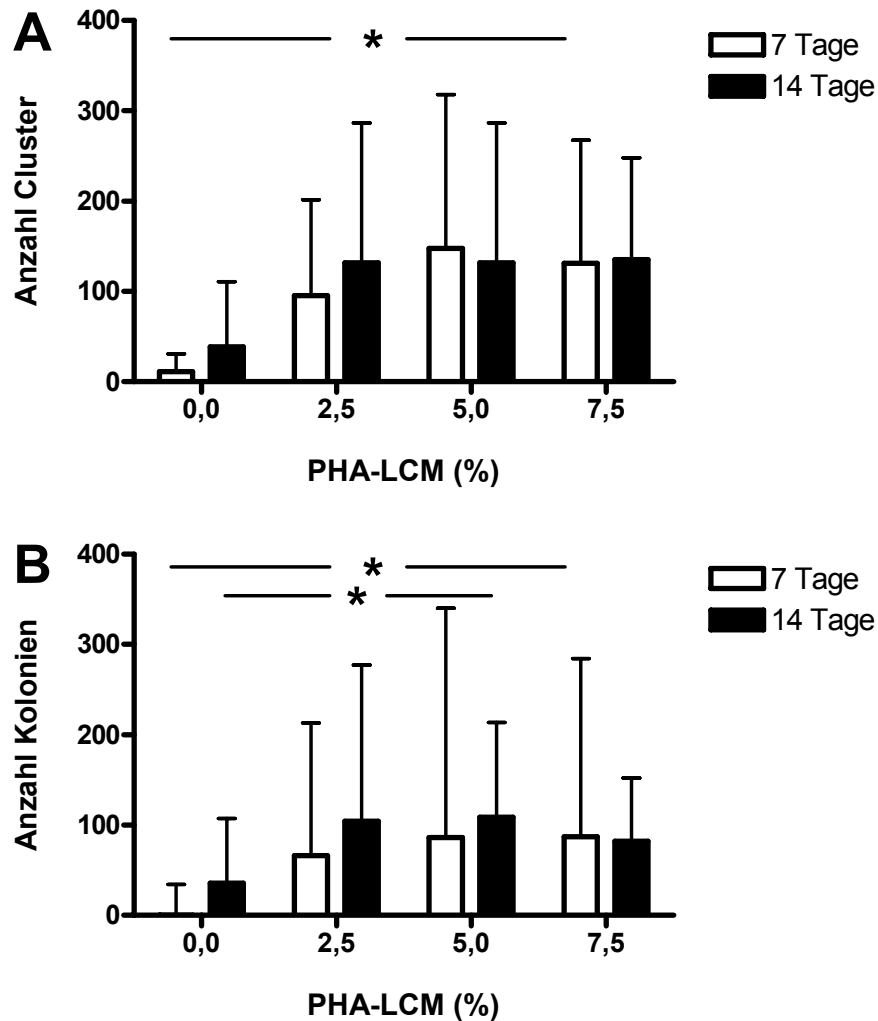


Abbildung 4: Signifikanter Einfluss der zugefügten PHA-LCM-Konzentration auf die Ausbildung von **A** Clustern und **B** Kolonien von CD34 positiven Knochenmark-Stammzellen nach 7 bzw. 14 Tagen Kultur. Insgesamt wurden Ansätze von 3 (7 Tage) bzw. 4 (14 Tage) Patienten ausgewertet. Bei den Clustern zeigte sich eine signifikante Zunahme an Tag 7 ($p=0,02$) und Tag 14 ($p=0,03$). Bei den Kolonien zeigte sich eine signifikante Zunahme an Tag 7 und Tag 14 (jeweils $p=0,02$).

Zellisolation verwendet. Der Mittelwert von allen verfügbaren Patienten zeigte bereits bei einer PHA-LCM-Konzentration von 2,5% eine deutliche Zunahme der Cluster- und Kolonienzahl, die sich bei einer Konzentration von 5% PHA-LCM in etwa stabil hielt (Abb. 4A und B). Bei einer Konzentration von 7,5% PHA-LCM konnte ein Rückgang der Koloniezahl am Tag 14 verzeichnet werden (Abb. 4B).

Da dies als eine toxische Wirkung von höheren PHA-LCM-Konzentrationen gedeutet werden kann, wurde bei allen weiteren Experimenten eine PHA-LCM-Konzentration von 5% gewählt. Diese Konzentration entspricht darüber hinaus der

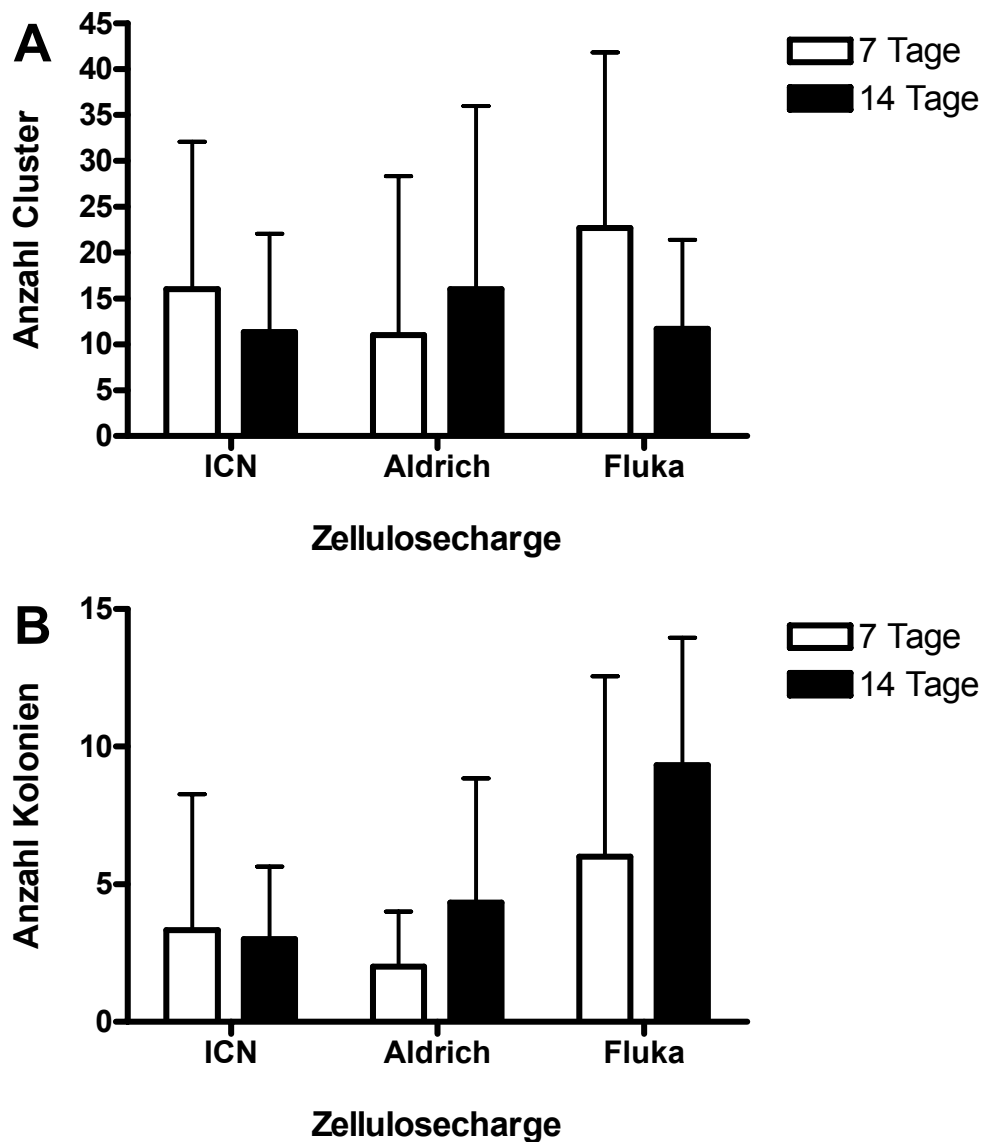


Abbildung 5: Einfluss der Cellulose-Charge auf die Ausbildung von **A** Clustern und **B** Kolonien von Knochenmark-Stammzellen in serumfreier Kultur in Anwesenheit von 5% PHA-LCM. Insgesamt wurden Ansätze von 3 Patienten nach 7 bzw. 14 Tagen Kultur ausgewertet.

der kommerziellen PHA-LCM-haltigen Cellulose sowie den Empfehlungen des herstellenden Labors (Terry Fox Laboratory, Canada).

4.1.4 Einfluss der Cellulose-Charge auf das Wachstumsverhalten von Knochenmark-Stammzellen in Kultur

Um die Kulturbedingungen zu optimieren, wurden Cellulosepräparate unterschiedlicher Hersteller in einem Dreifach-Ansatz untersucht. Hierzu wurden

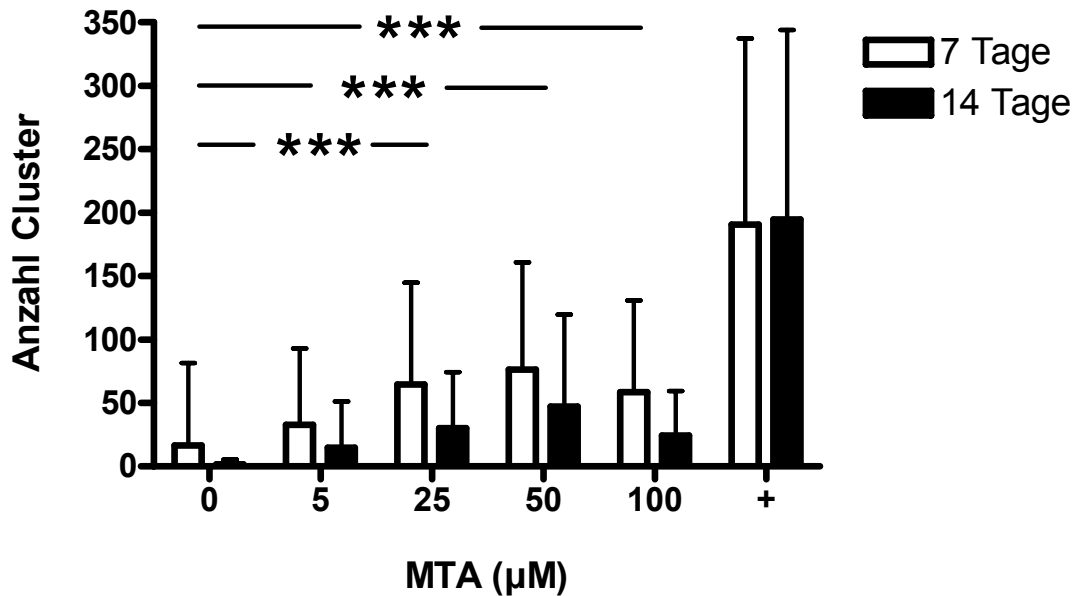


Abbildung 6: Signifikanter Einfluss der MTA Konzentration auf die Ausbildung von Clustern in methioninfreien Kulturbedingungen nach 7 bzw. 14 Tagen Kultur (jeweils $p < 0,0001$). Als Positivkontrolle wurde eine methioninhaltige Cellulose/Medium mit 5% PHA-LCM gemäß Material und Methoden verwendet. Insgesamt wurden Ansätze von 28 Patienten (Tag 7) bzw. 27 Patienten (Tag 14) ausgewertet (nicht separiert).

Knochenmark-Stammzellen eingesetzt. Verglichen wurden dabei Produkte der Hersteller ICN, Aldrich und Fluka (Abb. 5A Cluster und B Kolonien). Erwartungsgemäß zeigten die drei Präparate nur geringfügige Unterschiede. Da jedoch bei Verwendung der Cellulose des Herstellers Fluka die besten Ergebnisse sowohl für die Anzahl an Clustern als auch an Kolonien erzielt wurden, wurde in den weiteren Versuchen auf die Cellulose dieser Firma zurückgegriffen.

4.2 Einfluss unterschiedlicher Substrate des Methioninstoffwechsels auf das Wachstumsverhalten von Knochenmarkstammzellen in serumfreier Kultur

4.2.1 Einfluss der MTA-Konzentration auf das Wachstumsverhalten von Knochenmark-Stammzellen in serumfreier Kultur

Hauptschwerpunkt der Arbeit war die Analyse der MTAP-Aktivität in hämatopoetischen Stammzellen. Hierfür wurden zunächst methioninfreie Kulturbedingungen etabliert und anhand der Ausbildung von Stammzellclustern

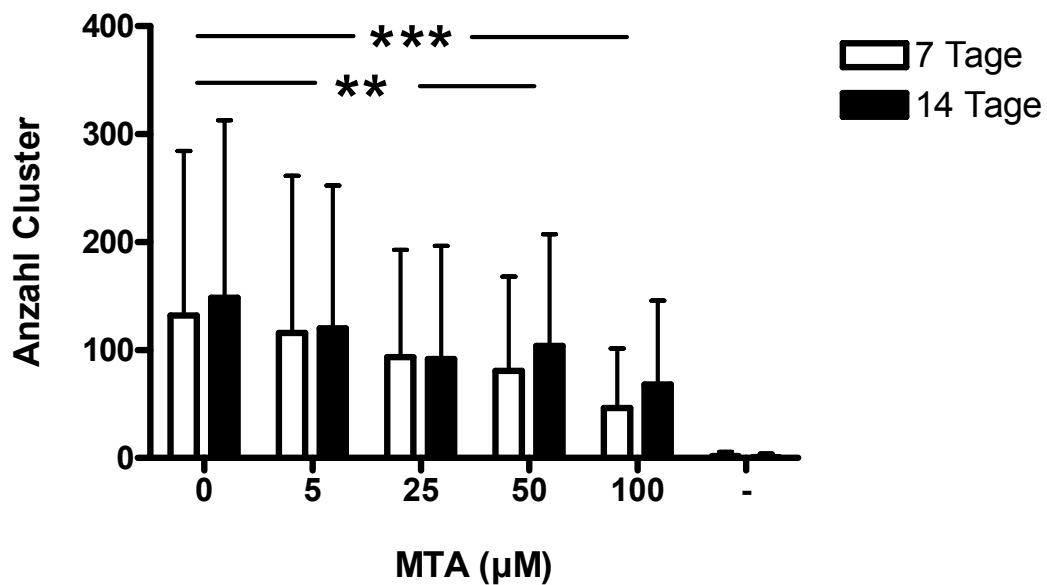


Abbildung 7: Einfluss der MTA Konzentration auf die Ausbildung von Clustern in methioninhaltigen Kulturbedingungen. Als Negativkontrolle wurde methioninfreie Cellulose/Medium ohne Zusatz von MTA verwendet. Insgesamt wurden Ansätze von 16 Patienten ausgewertet (vor Separation). Es zeigte sich eine hochsignifikante Abnahme der Clusterzahl mit zunehmender MTA Konzentration ($p < 0.0001$).

überprüft. Erwartungsgemäß waren unter methioninfreien Kulturbedingungen kaum Cluster (Tag 7, Tag 14) vorhanden. Der Einfluss von MTA - als endogenes Substrat der MTAP - wurde dann nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen analysiert und jeweils mit einem Ansatz unter methioninhaltigen Standardbedingungen verglichen (Abb. 6). Dabei zeigte sich eine Zunahme der Clusterzahl bis zu einer Konzentration von 50 µM MTA sowohl bei Auswertung nach 7 als auch 14 Tagen. Über diesen Wert hinausgehende Konzentrationen führten zu einer Abnahme der Clusterzahl, so dass in den weiteren Versuchen MTA in der Konzentration von 50 µM eingesetzt wurde.

4.2.2 Einfluss der MTA-Konzentration auf das Wachstumsverhalten in methioninhaltigen Kulturbedingungen bzw. unter gleichzeitiger Zugabe von Methionin

Die Frage eines möglichen additiven bzw. toxischen Effekts nach Zugabe von MTA zu methioninhaltigem Medium wurde in einem weiteren Versuch analysiert

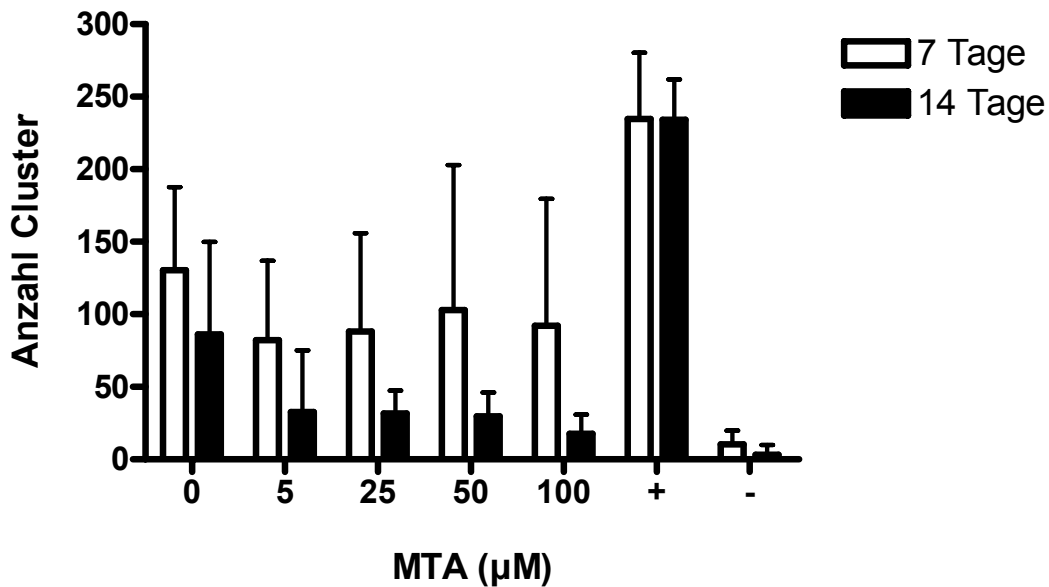


Abbildung 8: Einfluss der Kombination von MTA und externen Methionin (30µg/ml) auf die Ausbildung von Clustern in serumfreiem (=methioninfreiem) Kulturbedingungen. Als Negativkontrolle wurde methioninfreie Cellulose/Medium ohne Zusatz von MTA oder Methionin verwendet, als Positivkontrolle diente serumhaltige (=methioninhaltige) Cellulose/Medium. Insgesamt wurden Ansätze von 5 Patienten ausgewertet (vor Separation). Ein signifikanter Rückgang der Clusterzahlen konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,75$ nach 7 Tagen und $p=0,05$ nach 14 Tagen).

(Abb. 7). Dabei zeigte sich ein toxischer Effekt auf die Ausbildung von Stammzellclustern bei steigender Konzentration von MTA. Auch die gleichzeitige Zugabe von Methionin und MTA zu serumfreiem (methioninfreiem) Medium zeigte keinen additiven oder synergistischen Effekt. Nach 7 Tagen war bei einer Konzentration von 30 µg/ml Methionin und variablen MTA-Konzentrationen eine dosisunabhängige Clusterzahl von ca. 100 Clustern zu verzeichnen ($p = 0,75$). Nach 14 Tagen Kultur zeigte sich dagegen eine Tendenz zur Abnahme der Clusterzahl mit steigender MTA-Konzentration ($p = 0,05$), so dass von einem toxischen Effekt in der Kombination von Methionin und MTA erneut ausgegangen werden konnte (Abb. 8).

4.2.3 Einfluss der α -KMB-Konzentration auf das Wachstumsverhalten von Knochenmark-Stammzellen in serumfreier Kultur

Wie in der Einleitung beschrieben, stellt α -KMB sowohl ein Vorläufersubstrat des Methioninstoffwechsels über seine Umwandlung in Methionin als auch ein

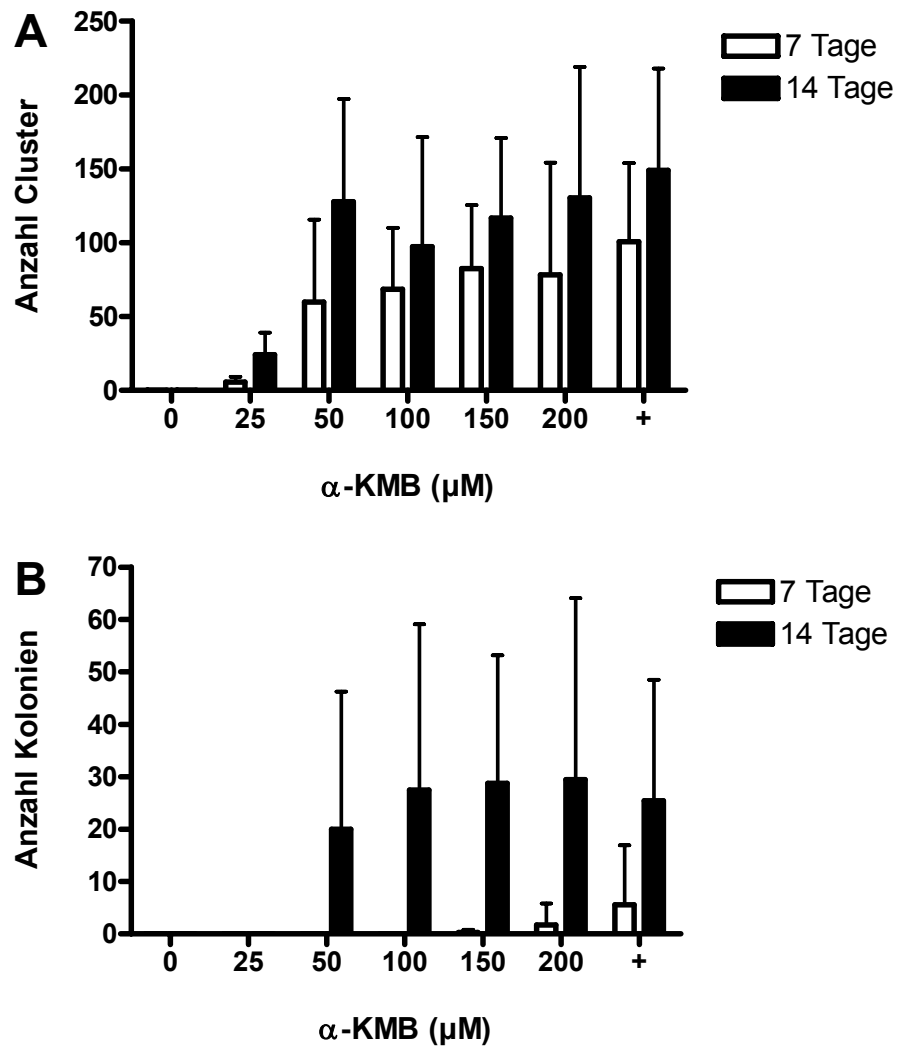


Abbildung 9: Einfluss der α -KMB Konzentration auf die Ausbildung von **A** Clustern und **B** Kolonien in methioninfreien Kulturbedingungen nach 7 bzw. 14 Tagen Kultur. Als Positivkontrolle diente methioninhaltige Cellulose/Medium. Zur Auswertung der Cluster wurden Ansätze von 8 Patienten herangezogen (nach Separation), bei den Kolonien wurden Ansätze von 8 Patienten nach 7 Tagen bzw. 7 Patienten nach 14 Tagen ausgewertet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl der Cluster nach 7 und 14 Tagen ($p=0,0002$ bzw. $p<0,0001$). Bei der Auszählung der Kolonien war die Zunahme nach 14 Tagen stärker ausgeprägt als nach 7 Tagen ($p<0,0001$ bzw. $p=0,0034$).

indirektes Spaltprodukt der MTAP über MTR-1-P dar. Den Zellen wird hiermit eine Möglichkeit der Methioningewinnung in methioninfreien Kulturen ohne notwendiges Vorhandensein von MTAP geboten. Das so gewonnene Methionin steht wieder zur Verfügung, u.a. für die Gewinnung von Adenin und MTR-1-P mittels MTAP. Für diesen Versuchsansatz wurden nur CD34-positiv selektionierte Stammzellfraktionen verwendet. Ab einer Konzentration von 50 μ M α -KMB zeigte

sich eine deutliche Zunahme in der Anzahl von Clustern und Kolonien (Abb. 9A und B). Der Effekt war bei Clustern sowohl nach 7 als auch 14 Tagen zu beobachten ($p = 0,0002$ und $p < 0.0001$), wohingegen die Anzahl an Kolonien am Tag 14 ($p < 0,0001$) deutlich über dem Wert von Tag 7 lag ($p = 0,0034$, Abb. 9B). In den nachfolgenden Versuchen wurde die Konzentration von $100 \mu\text{M}$ α -KMB gewählt, um sicher einen effektiven Wirkspiegel zu erreichen.

4.2.4 Einfluss der Adenin-Konzentration auf das Wachstumsverhalten von Knochenmark-Stammzellen in serumfreier Kultur

Um die funktionelle Aktivität des Methioninstoffwechsels und der MTAP-Aktivität in hämatopoetischen Stammzellen zu belegen, wurde im letzten Versuch eine Inhibition der MTAP-Aktivität über Zugabe des Spaltproduktes Adenin analysiert. Bei intakter MTAP müsste durch steigende Adeninkonzentration eine Enzyminhibition und damit verbunden eine abnehmende Differenzierungstendenz in Form geringerer Cluster- und Kolonienzahlen vorliegen. Bei ausreichend vorhandenem endogenen MTA - durch die konstante Zugabe von $100 \mu\text{M}$ α -KMB - zeigte sich mit steigender Adeninkonzentration eine Abnahme der Cluster- und Koloniezahl (Abb. 10A und B). Geht man von einer Enzyminhibition aus, kann dies als ein Hinweis auf eine vorhandene MTAP-Aktivität gedeutet werden.

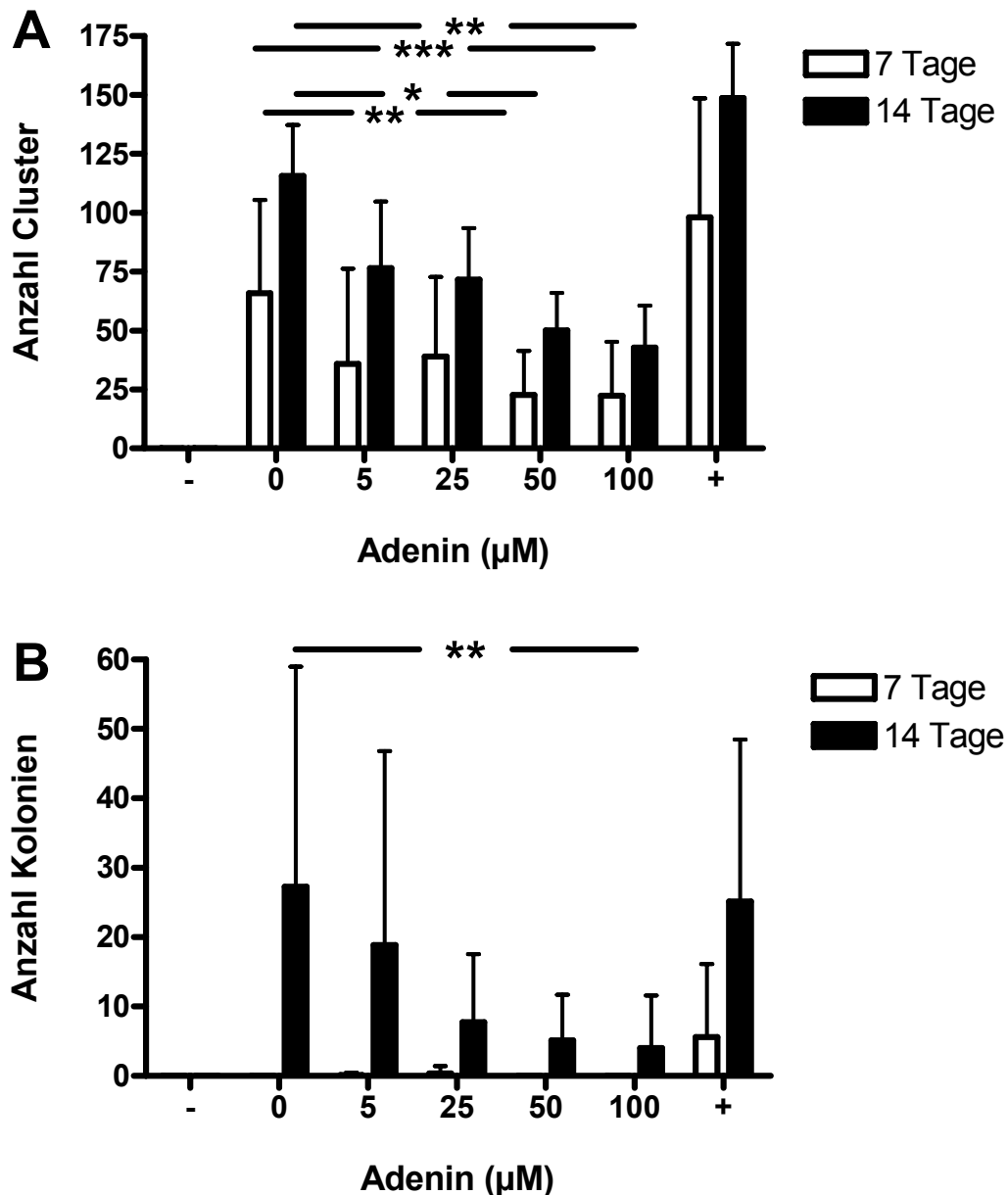


Abbildung 10: Einfluss der Adenin Konzentration auf die Ausbildung von **A** Clustern und **B** Kolonien in methioninfreien, aber α -KMB-haltigen (100 μ M) Kulturbedingungen. Als Positivkontrolle diente erneut methioninhaltige Cellulose/Medium. Methioninfreies Medium wurde als Negativkontrolle verwendet. Insgesamt wurden Ansätze von 9 Patienten nach 7 bzw. 7 Patienten nach 14 Tagen ausgewertet (nach Separation). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Clusterzahl mit steigender Adenin Konzentration ($p=0.0005$ nach 7 Tagen und $p=0.0036$ nach 14 Tagen). Bei den Kolonien war ein signifikanter Effekt lediglich nach 14 Tagen zu verzeichnen ($p=0.56$ nach 7 Tagen und $p=0.0039$ nach 14 Tagen).

5 Diskussion

MTAP stellt das Schlüsselenzym in der Gewinnung von Methionin und Adenin dar. Es spaltet MTA, das bei der Polyaminsynthese entsteht, in Adenin und MTR-1-P. Letzteres wird über α -KMB zu Methionin verstoffwechselt. Adenin wird für die Gewinnung von AMP benötigt.

MTAP wurde in fast allen normalen Säugetiergeweben nachgewiesen (CACCIAPUOTI et al., 1978; GARBERS, 1978; ZAPPIA et al., 1978; SAVARESE et al., 1981; SAVARESE et al., 1983a; SAVARESE et al., 1985). Es wurde gezeigt, dass 98% der Zellen des Knochenmarks MTAP-positiv sind (KAMATANI et al., 1981). Nur bei primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen, die lediglich eine kleine Fraktion des Knochenmarks darstellen (0,1%) (METCALF, 1989), war der Enzymstatus aus methodischen Gründen ungeklärt. Bei zahlreichen malignen Geweben wie Gliomen (KAMATANI et al., 1981), Lungenkarzinomen (NOBORI et al., 1993), rektalen Adenokarzinomen (FITCHEN et al., 1986), Osteosarkomen und Leukämien (FITCHEN et al., 1986; TRAWEEK et al., 1988) wurde dagegen ein Fehlen der MTAP-Aktivität nachgewiesen (KREIS et al., 1980; KANO et al., 1982; NOBORI et al., 1991; DELLA RAGIONE et al., 1992).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der MTAP-Aktivität in primären hämatopoetischen Stammzellkulturen und deren mögliche Bedeutung für die Therapie maligner Erkrankungen. Für eventuelle Therapiemöglichkeiten von malignen Tumoren, die MTAP-defizient sind, ist es von Bedeutung, den MTAP-Status der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu klären und damit zu wissen, ob diese vor der Toxizität einer solchen selektiven Therapie geschützt werden können. Dafür wurden zunächst die Kultur- und Testbedingungen zur Beantwortung der Fragestellung etabliert. Als Surrogatmarker dienten die Ausbildung von Stammzellkolonien bzw. -clustern nach *in vitro*-Kultur.

5.1 MTA-Toxizität in hämatopoetischen Stammzellen

Bei der Analyse der methioninfreien Stammzellkulturen nach Zugabe von verschiedenen MTA-Konzentrationen ergab sich eine Proliferation, gemessen an der Entwicklung von Clustern und Kolonien. Es fiel auf, dass zwar in den geringen Konzentrationen eine leichte Zunahme der Clusterbildung zu verzeichnen war,

aber es unter der Zugabe von hohen MTA-Dosen zu einer Abnahme der Clusterzahlen kam. Es scheint keinen optimalen Wirkungsbereich zu geben, da nie Proliferationsraten erreicht wurden, die der methioninhaltigen Kontrollgruppe gleichkamen. Auch wenn durch eine alleinige MTA-Zugabe nicht die Zahlen der Kolonien und Cluster der methioninhaltigen Kontrollkulturen erlangt werden konnten, so zeigte sich doch eine Proliferation, die in den methioninfreien Kontrollkulturen ohne MTA-Zusatz nicht zu beobachten war. Dies kann als ein Hinweis auf die Anwesenheit von MTAP in den hämatopoetischen Stammzellen gedeutet werden. Den Rückgang der Proliferationsrate unter hohen MTA-Konzentrationen deuteten wir als toxischen Effekt des MTA, der auch aus der Literatur bekannt ist (WOLFORD et al., 1984a; RISCOE et al., 1987; YU et al., 1997). Auch wenn der zugrundeliegende Pathomechanismus letztendlich unbekannt ist, so wird die dokumentierte Sensitivität auf eine Inhibition der für die Zelldifferenzierung notwendigen Methylierungsreaktionen bzw. auf die reduzierte Polyaminsynthese zurückgeführt (BORCHARDT, 1980; MAHER, 1993). Während der normalen Hämatopoese wird wohl das endogen produzierte MTA rasch in Adenin und Methionin verstoffwechselt (PEGG, WILLIAMS-ASHMAN, 1969), um intrazellulär die toxische MTA-Akkumulation zu verhindern. Bei der in unserem Versuch geschilderten exzessiv durchgeführten exogenen Zugabe von MTA ist somit die suffiziente Verstoffwechselung des MTA nicht mehr möglich und die MTA-Akkumulation toxisch.

Unterstützt wird dies durch die Auswertung der methioninhaltigen Ansätze mit MTA-Zusatz in steigender Konzentration (Abb. 7). Es zeigt sich in niedrigen Konzentrationsbereichen nur ein minimaler Rückgang der Proliferation. Dieser stellte sich mit steigender MTA-Konzentration deutlicher dar. Auch dieses Ergebnis ist als Hinweis auf einen toxischen Effekt der zusätzlichen MTA-Belastung zu sehen, da das MTA wahrscheinlich nicht schnell genug verstoffwechselt werden kann.

In einem weiteren Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob es bei steigenden MTA-Konzentrationen in methioninfreien Zellkulturen durch Zugabe einer konstanten Menge Methionins ebenfalls zu einem toxischen Effekt kommt (Abb. 8). Am 7. Tag war schon ein leichter Wachstumsunterschied erkennbar. Am 14. Tag war eine Abnahme der Clusterzahl mit steigender MTA-Konzentration deutlich

zu sehen. Da in dem Ansatz mit Methionin ohne MTA-Zugabe höhere Clusterzahlen zu beobachten waren als in den Ansätzen mit MTA, ist auch hier von einem negativen bzw. toxischen Effekt des MTA auszugehen - wenngleich diese Zahlen keine statistische Signifikanz erreichten. Eine toxische Wirkung von MTA konnte ebenfalls bei PHA-stimulierten Lymphozyten gesunder Probanden bestätigt werden (BATOVA et al., 2006).

Diese Untersuchungsergebnisse führen zu einer weiteren Möglichkeit des Beweises der MTAP-Positivität hämatopoetischer Stammzellen. Geht man davon aus, dass diese MTAP-positiv sind, müssten sie nach Zugabe eines anderen Substrates der MTAP die Fähigkeit zur Proliferation wiedererlangen. In einer Arbeit der Arbeitsgruppe von Yu wurde dies auch bestätigt. Sie zeigte in mehreren Versuchsansätzen, dass die CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen durch die alleinige Zugabe von 5'-Deoxadenosin als exogenes Substrat der MTAP vor der Zytotoxizität des Alanosins geschützt waren und proliferierten (YU et al., 1997). Auch hier zeigte sich zuvor bei einer Zugabe von MTA als Substrat der MTAP ein Rückgang des Koloniewachstums.

5.2 Einfluss von α -KMB - ein Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels

In einer weiteren Versuchsreihe wurde methioninfreien Stammzellkulturen α -KMB zugesetzt. α -KMB ist ein Zwischenprodukt der Methioningewinnung aus MTR-1-P (BACKLUND, SMITH, 1981). Es handelt sich somit um ein Substrat im Methioninstoffwechsel, das der MTAP nachgeschaltet ist.

Unter Zugabe von α -KMB in unterschiedlicher Konzentration zu methioninfreien Stammzellkulturen zeigte sich eine Zunahme der Proliferation und Differenzierung an Hand der ausgezählten Cluster und Kolonien. Die Daten der Auszählung waren denen der methioninhaltigen Kontrollkulturen vergleichbar. Es zeigte sich ein Optimum bei etwa 100-150 μ M α -KMB. Dass eine Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen in serumfreien Kulturbedingungen unter alleiniger Zugabe von α -KMB auftrat, lässt auf eine vorhandene MTAP-Aktivität in hämatopoetischen Stammzellen schließen, da eine Adenin- und auch erneute Methioningewinnung nur bei vorhandener MTAP-Aktivität möglich ist.

Das zugeführte α -KMB steht als Methioninquelle zur Verfügung. Das so gewonnene Methionin kann im Weiteren wieder dem Stoffwechsel zugeführt werden und wird schließlich über MTA mittels MTAP in Adenin und MTR-1-P abgebaut. Es stehen somit dem Zellzyklus der Stammzellkulturen Methionin und Adenin in ausreichender Menge zur Verfügung. Dies lässt schließen, dass bei Anwesenheit von α -KMB als Methioninquelle keine toxischen MTA-Spiegel entstehen, da es „natürlich“ entsteht und nicht von extern zugeführt wird. Dies ist als ein deutlicher Hinweis auf die MTAP-Aktivität der hämatopoetischen Stammzellen zu werten.

Auch Ogier et al. machten die Beobachtung, dass die Zugabe von α -KMB das Wachstum von vier verschiedenen methioninabhängig wachsenden Zelllinien in methioninfreier Umgebung steigerte und somit wahrscheinlich eine bisher unbeachtete Rolle in der Proliferation der Zellen spielt. Vielleicht liegt bei MTAP-negativen Zelllinien ein weiterer Defekt auf dem Weg zwischen MTR-1-P und α -KMB vor (OGIER et al., 1993).

Daraus ergab sich die Überlegung, dass die Methionin- und Adeningewinnung im methioninfreien Milieu nicht allein von der MTAP-Aktivität der Zelllinien abhängig sind. Dies wird z.B. von der Arbeitsgruppe um Tang diskutiert. Sie fand heraus, dass es zwar eine Korrelation in Tumorzelllinien zwischen dem methioninabhängigem Wachstum und dem Expressionsdefekt der MTAP als Schlüsselenzym im Methioninstoffwechsel/-abbau gibt, dass dieser Defekt aber nicht allein für die Methioninabhängigkeit verantwortlich ist. In der Untersuchung wurde einer MTAP-negativen - aber Methionin-Synthetase-positiven - Zelllinie (MCF7) *MTAP*-cDNA zugeführt. Diese substituierte Zelllinie proliferierte nach Zugabe von MTA als Substrat der MTAP, wenn auch weniger als nach Methioninzugabe. Eine deutlich geringere Proliferationsrate zeigte sich nach Zugabe von Homocystein als Methioninquelle. Dabei war die Erwartung gewesen, dass diese mit MTAP transfizierte Zelllinie methioninunabhängig – durch die Zugabe von Homocystein als Methioninquelle - wächst. Aber dazu war diese manipulierte Zelllinie nicht in der Lage (TANG et al., 2000). Die Methioninabhängigkeit mancher Tumorzellen muss also noch andere Ursachen als den MTAP-Defekt haben, die bisher noch nicht geklärt sind. Außerdem wurden in den letzten Jahren auch eine Hypermethylierung im Promotorbereich

identifiziert (ISHII et al., 2005; HELLERBRAND et al., 2006), durch die auf transkriptioneller Ebene bei intaktem *MTAP*-Gen eine *MTAP*-Defizienz begünstigt wird.

5.3 Zugabe von Adenin

Im letzten Versuchsansatz der hier vorliegenden Arbeit wurde unter Zugabe einer konstanten Menge an α -KMB (100 μ g/ml) in die methioninfreien Kulturen - einer vermeintlich ausreichenden Menge an endogen produziertem MTA - Adenin in steigender Konzentration beigegeben. Der Ansatz mit alleiniger α -KMB Gabe zeigt annähernd die Zahlen der methioninhaltigen Kontrollkultur. Unter steigender Adeninkonzentration kam es zu einer signifikanten Abnahme der Cluster- bzw. Koloniezahlen. Diesen Effekt führten wir auf eine negative Rückkopplung durch die zusätzlich zugeführten Adeninmengen zurück. Durch die alleinige externe Zufuhr von α -KMB ist wohl eine ausreichende Methionin- und Adeninproduktion möglich. Somit ist eine zusätzliche Adeningabe unter α -KMB-Einfluss sozusagen unnötig und es kommt zu einer Inhibition und geringeren Proliferationsrate. Interessant wäre eine Versuchsreihe mit alleiniger Zugabe von Adenin in methioninfreie und methioninhaltige Stammzellkulturbedingungen gewesen. Dieser Ansatz wurde jedoch nicht durchgeführt. Ferner wäre es rückblickend wichtig zu wissen, wie viel Adenin in den methioninfreien Kulturansätzen durch die wohl vorhandene MATP gewonnen wird. Hiefür hätte man den Adeningehalt bestimmen müssen, dies ist jedoch nicht geschehen.

5.4 MTAP-Aktivität in hämatopoetischen Stammzellen

Die zentrale Frage dieser Arbeit ist der *MTAP*-Status der hämatopoetischen Stammzellen. Liegt eine ausreichende *MTAP*-Aktivität in hämatopoetischen Vorläuferzellen vor, sollten diese unter methioninfreien Bedingungen nach Zugabe von MTA ihren Methioninbedarf über die Remethylierung von MTR-1-P sowie ihren Adeninbedarf decken können. Wären sie *MTAP*-negativ, würden sie zugrunde gehen bzw. keine Proliferation und/oder Differenzierung zeigen. Zum Zeitpunkt der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit lagen entsprechende Daten nur aus Zellkulturexperimenten an hämatopoetischen Zelllinien vor (WOLFORD et al., 1984a; RISCOE et al., 1987). Anhand der hier

erhobenen Ergebnisse bei MTA-Zugabe lässt sich nicht eindeutig beweisen, dass die hämatopoetischen Stammzellen eine MTAP-Aktivität besitzen. Die nachgewiesene Proliferation nach MTA-Zugabe lässt sich lediglich als Hinweis auf eine vorhandene MTAP-Aktivität werten, da bei weiten nicht das Ausmaß der Proliferation in den methioninhaltigen Kontrollkulturen erlangt wird. Spätere Daten haben die Versuche aus primären Stammzellkulturen bestätigt (YU et al., 1997). Damit kann in der Zusammenschau unserer als auch der publizierten Daten von einer intakten MTAP-Aktivität in humanen hämatopoetischen Stammzellen ausgegangen werden.

5.5 Bedeutung der Methylothioadenosin-Phosphorylase-Aktivität als Ansatzpunkt einer gezielten Tumorthherapie

Die Fragestellung der MTAP-Aktivität hämatopoetischer Stammzellen ist von zentraler Bedeutung für die Entwicklung einer gezielten Tumorthherapie. MTAP-negative Zellen sind wie bereits in der Einleitung beschrieben nicht in der Lage, Adenin über die Verstoffwechselung von Methionin zu gewinnen und damit auf die *de novo*-Synthese von Adenin-Nukleotiden angewiesen. Wird die *de novo*-AMP-Synthese in den MTAP- defizienten Zellen geblockt, so sind diese Zellen jeder Möglichkeit einer Purinsynthese, der DNA-Synthese und der Energiegewinnung beraubt. Es folgt der Untergang der Zellen. MTAP-positive Zellen - nach dem Resultat der Arbeit also auch die hämatopoetischen Stammzellen - könnten eine entsprechende Therapie überleben, wenn ihnen ein Substrat für MTAP geliefert würde, damit sie Adenin und Methionin gewinnen könnten.

5.5.1 Hemmung der *de novo*-Purinsynthese

Für die Hemmung der *de novo*-Purinsynthese gibt es mehrere Möglichkeiten. Azaserin (= O-Diazoacetyl-L-Serin) ist ein Strukturanalagon des Glutamins und inhibiert die *de novo*-Purinsynthese auf der Stufe der Übertragung des Glutaminstickstoffs auf das Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat. Ferner inhibiert es den Einbau des C-Atoms 8 (Transformylase) in das Puringerüst und die Überführung von Xanthosinmonophosphat in Guanosinmonophosphat.

Lometrexol (= 5,10-Dideazatetrahydrofolsäure, DDATHF) ist ein Folsäureantagonist und inhibiert das folatabhängige Enzym Glycinamid-Ribonukleotid-Formyltransferase (BALDWIN et al., 1991) sowie die Aminoimidazol-Carboxamid-Transformylase (BEARDSLEY et al., 1989). Beide Enzyme sind in der *de novo*-Synthese der Purine aktiv. Lometrexol arretiert die Zellen in der S-Phase des Zellwachstums (ERBA et al., 1994).

Methotrexat ist ein Derivat der Folsäure und hemmt die Dihydrofolatreduktase. Es blockiert die Umwandlung der Dihydrofolsäure, das natürliche Substrat der Dihydrofolatreduktase, zur Tetrahydrofolsäure. Dadurch wird der für die Biosynthese von Thymidin und Purinen wichtige C1-Stoffwechsel inhibiert.

Ein weiterer Inhibitor ist L-Alanosin. L-Alanosin blockiert ausschließlich die AMP *de novo*-Synthese und ist ein Aminosäureanalogon, das aus *Streptomyces alanosinicus* gewonnen wird (MURTHY et al., 1966). Es hemmt die Adenylsuccinat-Synthetase-Aktivität und somit die *de novo*-Synthese von AMP aus IMP.

5.5.2 Schutz der MTAP-positiven Zellen

Um die MTAP-positiven Zellen vor der Zytotoxizität von z.B. Alanosin schützen zu können, muss ihnen die Möglichkeit der Proliferation gegeben werden, d.h. neben der Möglichkeit der Methioningewinnung auch die Möglichkeit der Adeningewinnung. Sie brauchen ein Substrat für ihre MTAP. Eine Möglichkeit ist exogen zugeführtes MTA. In einer Untersuchung von Batova et al. wurden u.a. zwei T-ALL Zelllinien in ihrem Verhalten nach Zugabe von MTA unter dem zytostatischen Effekt von Alanosin verglichen. Die MTAP-positive Zelllinie (Molt-4) proliferierte unter MTA, die MTAP-negative Zelllinie (CEM) proliferierte nicht. Ohne Zugabe von MTA zeigten beide Zelllinien unter dem Alanosin kein Wachstum von Kolonien (BATOVA et al., 1996). Es konnte kein kompletter Schutz der Molt-4 Zellen durch MTA erreicht werden. Yu ersetzte MTA gegen das weniger toxische 5'-Deoxyadenosin. Damit konnte eine komplette Rettung der Molt-4 Zellen gegenüber Alanosin erzielt werden. Im Gegensatz dazu konnte die MTAP-negative CEM-Zelllinie nicht gerettet werden (YU et al., 1997; BATOVA et al., 1999). Da 5'-Deoxyadenosin zum Teil als Agonist des Adenosinrezeptor reagiert

(BRUNS, 1980), kommt es zu den in Veröffentlichungen beschriebenen Nebenwirkungen wie Entzündungsreaktionen, Vasodilatation und Immunsuppression (HUNTING, HENDERSON, 1978; OLSSON et al., 1979; NASLUND et al., 1986; MUNSHI et al., 1988; SIDDIQI et al., 1995; BLAY et al., 1997). Um dieser Idee den Einzug in klinische Studien ebnet zu können, war man gezwungen, ein neues Substrat für MTAP zu finden. Es wurde ein offensichtlich nicht-toxisches Substrat mit dem Namen 9-beta-D-Erythrofuransyladenin (EFA) synthetisiert, das auf hämatopoetische Vorläuferzellen eine deutlich geringere toxische Wirkung ausübte als MTA (BATOVA et al., 2006). Ebenso waren MTAP-positive MOLT-4 Zellen vor dem zytotoxischen Alanosineffekt geschützt. EFA ist ein kompetitiver Inhibitor des Adenosinrezeptors, daher mag es nicht zu den Nebenwirkungen kommen, die unter 5'-Deoxyadenosin beobachtet werden konnten (BRUNS, 1980). Die möglichen Nebenwirkungen, die es als Adenosinrezeptorinhibitor verursacht, sind noch zu untersuchen.

5.5.3 Therapeutische Ansätze bei MTAP-negativen Tumorzellen

In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen über Möglichkeiten einer selektiven Therapie MTAP-negativer Zellen durchgeführt. Die Vorstellung MTAP-negative Tumorzellen mit einer zytostatischen Therapie zu eliminieren und gleichzeitig die gesunden MTAP-positiven Zellen zu retten, wäre mit einer deutlichen Reduktion der Nebenwirkungen einer zytostatischen Therapie verbunden. Eine der Voraussetzungen für einen solchen Therapieansatz ist die Kenntnis des *MTAP*-Status des vorhandenen Tumors. Viele maligne Tumore wurden bereits auf ihre MTAP-Aktivität bzw. ihren *MTAP*-Status untersucht. Das *MTAP*-Gen liegt in enger Nachbarschaft zu den Tumorsuppressorgenen *CDKN2A* (p16^{INK4a}) und *CDKN2B* (p15^{INK4b}) auf Chromosom 9p21 (KAMB et al., 1994). Tumorzellen mit einer Deletion des *MTAP*-Gens weisen häufig auch eine Deletion der Gene *CDKN2A* (p16^{INK4a}) und *CDKN2B* (p15^{INK4b}) auf (TOOHEY, 1978; KAMATANI et al., 1981; JEN et al., 1994; MORI et al., 1994; OKUDA et al., 1995; OLOPADE et al., 1995; NOBORI et al., 1996; ZHANG et al., 1996). Es zeigen z.B. gut 30 % aller T-ALL Patienten bei Diagnose bzw. knapp 40 % bei einem Rezidiv eine Deletion im *MTAP*-Gen sowie im *CDKN2A*-Gen (BATOVA et al., 1996). Diccianni zeigte, dass bei mehr als 60% der untersuchten T-ALL Patienten eine

Deletion im Chromosom *9p21* einschließlich des Gens *p16* und/oder *p15* vorliegt (DICCIANNI et al., 1997).

Bei vielen malignen Tumoren wurden ein Fehlen der MTAP-Aktivität und/oder eine Deletion des *MTAP*-Gens gefunden. Diese Tumore umfassen z.B. Gliome (NOBORI et al., 1991), Lungenkarzinome (NOBORI et al., 1993; OLOPADE et al., 1993), Leukämien (non-lymphoid) (FITCHEN et al., 1986; TRAWEEK et al., 1988) und pleurale Mesotheliome (ILLEI et al., 2003). Da sie allerdings keinen einheitlichen Phänotyp zeigen (KAMATANI et al., 1982; FITCHEN et al., 1986; TRAWEEK et al., 1988), wäre es vor Therapiebeginn sinnvoll den Genstatus (*MTAP*-, oder *p16^{INK4a}*-Defekt) der Tumore (z.B. T-ALL) zu kennen, um eine Voraussage über die Therapiesensitivität geben zu können (EFFERTH et al., 2002). Nicht zuletzt auch deshalb, da schon beobachtet wurde, dass eine Deletion des *MTAP*-Gens und eine MTAP-Negativität der Tumorzellen eine schlechte Prognose bedingen - z.B. bei Mantelzell-Lymphomen (MARCE et al., 2006). Hiefür sind schnelle und saubere Möglichkeiten zur Erhebung des MTAP-Status erforderlich. Es wurde eine quantitative real-time PCR zur Identifizierung der *MTAP*- sowie *p16^{INK4a}*-Gendeletion etabliert. Untersucht wurden diese Gendeletionen im peripheren Blut von ATL-Patienten (adult T-cell-leukemia) sowie in Knochenmarksproben von Kindern mit T-ALL (T-cell acute lymphoblastic leukemia). Dieser Assay war im Vergleich zu anderen Methoden – wie eine Southern blot Analyse, quantitative Endpunkt-PCR oder Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) – sensitiver und schneller (M'SOKA T et al., 2000).

Da MTAP eine wichtige Rolle bei der Gewinnung von Adenin und Methionin während der Polyaminsynthese inne hat, scheinen maligne MTAP-negative Zellen mehr von exogen zugeführtem Adenin und Methionin abhängig zu sein als MTAP-positive Zellen (KAMATANI et al., 1981; KUBOTA et al., 1983; CHRISTA et al., 1984; NOBORI et al., 1993). Dies erklärt auch die gesteigerte Empfindlichkeit der MTAP-negativen Zellen gegenüber einer Hemmung der *de novo*- Purinsynthese.

Unter diesem Aspekt sollten auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Efferth erwähnt werden. Es wurde gezeigt, dass es durchaus sinnvoll ist, auch den *p16^{INK4a}*-Defekt zu untersuchen. Das Tumorsuppressorgen *p16^{INK4a}* beeinflusst die Empfindlichkeit von Tumorzellen auf eine Chemotherapie (STONE et al., 1996). Es veranlasst den Zellzyklus in der Phase G1 zu verharren und reduziert

dadurch die Proliferation und das Ansprechen auf eine Chemotherapie (STONE et al., 1996). Die Regulation des Zellzyklus ist bekannt als ein wichtiger Faktor der Empfindlichkeit gegenüber einer Chemotherapie (KOHN et al., 1994; CORDON-CARDO, 1995). Schnell wachsende Gewebe bzw. Zellen sind empfindlicher gegenüber Zytostatika als langsam wachsende. Dies konnte Efferth mit einer *MTAP*- sowie *p16^{INK4a}*-defekten T-ALL Zelllinie (CEM-S) nachvollziehen, die mit *p16^{INK4a}*- bzw. *MTAP*-Vektor transfiziert wurde. Bei mit *p16^{INK4a}*-Vektor transfizierten Zellen zeigte sich eine geringere Sensitivität gegenüber Zytostatika als bei Zellen, die mit einem *MTAP*-Vektor transfiziert wurden (EFFERTH et al., 2002). In einem *in vivo* Modell wurde das Wachstum *MTAP*-defizienter und *MTAP*-transfizierter Tumorzellen nach Transfer in Nacktmäusen unter Therapie mit L-Alanosin verglichen. Hier konnte der inhibitorische Effekt von L-Alanosin auf das Wachstum *MTAP*-defizienter Tumoren bestätigt werden (LI et al., 2004).

Die Forschergruppe um Chen demonstrierte, dass *MTAP*- und *p16^{INK4a}*-negative Pankreaskarzinomzellen empfindlicher auf MTX reagieren als *MTAP*- und *p16^{INK4a}*-positive Pankreaskarzinomzellen (CHEN et al., 1996). Um herauszufinden ob die *MTAP*-Aktivität eine Veränderung im Verhalten der *MTAP*- und *p16^{INK4a}*-negativen Zellen bringt, führten sie *MTAP*-cDNA in diese ein. Es zeigte sich, dass die *MTAP*-abhängigen Stoffwechselwege wieder intakt waren, da sich die Rate der *de novo*-Purinsynthese reduzierte und sich die Empfindlichkeit gegenüber MTX verringerte (CHEN et al., 1997). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Untersuchung einer Zelllinie eines kleinzelligen Lungenkarzinoms (A 549) gemacht. Auch hier führte eine Transfektion von *MTAP*-cDNA in *MTAP*-negative Zellen zu einer geringeren Empfindlichkeit gegen Folate (CHEN et al., 1997).

5.5.4 Therapeutische Möglichkeiten von Alanosin

L-Alanosin stellt einen potenten Inhibitor der *de novo*-AMP-Synthese dar (GALE, SCHMIDT, 1968; ANANDARAJ et al., 1980; TYAGI, COONEY, 1980, 1984). Der Metabolit L-Alanosinyl-5-Amino-4-Imidazol-Carboxylsäure-Ribonukleotid (ALA-AICOR) des L-Alanosins hemmt die Adenylosuccinat-Synthetase, die notwendig ist für die Umwandlung von IMP in AMP. Die Wirkung ist spezifisch, so dass dadurch lediglich die ATP-Gewinnung, nicht aber die GTP-Synthese gehemmt

wird. Darüber hinaus ist der wachstumshemmende Effekt *in vitro* komplett durch die Zugabe von Adenin reversibel, einhergehend mit einer Wiederherstellung der ATP-Reserven (GALE, SCHMIDT, 1968; GRAFF, PLAGEMANN, 1976). Aufgrund dieser speziellen Wirkweise wäre Alanosin ein idealer Kandidat für eine gezielte Therapie von MTAP-negativen Tumoren (BATOVA et al., 1999). Folglich stellt Alanosin eine Möglichkeit der selektiven Therapie von MTAP-negativen Tumoren dar, insbesondere wenn diese schon gegen Methotrexat oder Trimetrexate resistent sind (EFFERTH et al., 2002).

Das therapeutische Konzept könnte wie folgt aussehen: MTAP-negative Tumoren (z.B. T-ALL) werden mit Alanosin behandelt und gleichzeitig werden die MTAP-positiven Zellen vor dem Untergang durch die Zugabe des endogenen MTAP-Substrates MTA bzw. eines exogenen MTAP-Substrates (z.B. 5'-Desoxyadenosin, EFA) geschützt.

Bereits vor mehr als 20 Jahren gab es klinische Studien der Phase I und II für Alanosin bei Patienten mit Leukämien und soliden Tumoren, die jedoch nicht zu einer Remission geführt haben (DOSIK et al., 1982; GOLDSMITH et al., 1983; WEICK et al., 1983; ELSON et al., 1988). Im Rahmen dieser Studien waren die Patienten nicht auf den MTAP-Status des Tumors untersucht worden. In diesen Studien wurden jedoch keine Patienten mit Gliomen oder T-ALL – beide Tumorarten haben eine hohe Inzidenz an MTAP-Defizienz – eingeschlossen, weshalb die Wirksamkeit dieses therapeutischen Prinzips nach wie vor nicht geklärt ist. Eine aktuell veröffentlichte Phase II Studie zur Prüfung der Effektivität und Verträglichkeit einer Alanosintherapie bei Patienten mit MTAP-negativen soliden Tumoren (Mesotheliomen, kleinzelligen Lungenkarzinomen, Weichteilsarkomen, Osteosarkomen und Pankreaskarzinom) zeigte keinen Erfolg der Therapie (KINDLER et al., 2008). Letztendlich müssen weitere klinische Studien zeigen, ob die Gabe von Alanosin bei gleichzeitiger „Rettung“ der MTAP-positiven Zellen durch ein exogenes MTAP-Substrat ein wirksames Therapieprinzip MTAP-negativer Tumoren mit geringer Nebenwirkungsrate darstellt.

6 Literaturverzeichnis

1. Anandaraj SJ, Jayaram HN, Cooney DA, Tyagi AK, Han N, Thomas JH, Chitnis M, Montgomery JA (1980) Interaction of L-alanosine (NSC 153, 353) with enzymes metabolizing L-aspartic acid, L-glutamic acid and their amides. *Biochem Pharmacol* 29:227-245
2. Avila MA, Garcia-Trevijano ER, Lu SC, Corrales FJ, Mato JM (2004) Methylthioadenosine. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2125-2130
3. Backlund PS, Jr., Chang CP, Smith RA (1982) Identification of 2-keto-4-methylthiobutyrate as an intermediate compound in methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine. *J Biol Chem* 257:4196-4202
4. Backlund PS, Jr., Smith RA (1981) Methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine in rat liver. *J Biol Chem* 256:1533-1535
5. Baldwin SW, Tse A, Gossett LS, Taylor EC, Rosowsky A, Shih C, Moran RG (1991) Structural features of 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolate that determine inhibition of mammalian glycinamide ribonucleotide formyltransferase. *Biochemistry* 30:1997-2006
6. Batova A, Cottam H, Yu J, Diccianni MB, Carrera CJ, Yu AL (2006) EFA (9-beta-D-erythrofuranosyladenine) is an effective salvage agent for methylthioadenosine phosphorylase-selective therapy of T-cell acute lymphoblastic leukemia with L-alanosine. *Blood* 107:898-903
7. Batova A, Diccianni MB, Nobori T, Vu T, Yu J, Bridgeman L, Yu AL (1996) Frequent deletion in the methylthioadenosine phosphorylase gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: strategies for enzyme-targeted therapy. *Blood* 88:3083-3090
8. Batova A, Diccianni MB, Omura-Minamisawa M, Yu J, Carrera CJ, Bridgeman LJ, Kung FH, Pullen J, Amylon MD, Yu AL (1999) Use of alanosine as a methylthioadenosine phosphorylase-selective therapy for T-cell acute lymphoblastic leukemia in vitro. *Cancer Res* 59:1492-1497
9. Beardsley GP, Moroson BA, Taylor EC, Moran RG (1989) A new folate antimetabolite, 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolate is a potent inhibitor of de novo purine synthesis. *J Biol Chem* 264:328-333
10. Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, Menetrier-Caux C, Schemann S, Negrier S, Philip T, Favrot M (1997) Role of interleukin-6 in the paraneoplastic

- inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 72:424-430
11. Borchardt RT (1980) S-Adenosyl-L-methionine-dependent macromolecule methyltransferases: potential targets for the design of chemotherapeutic agents. *J Med Chem* 23:347-357
 12. Bruns RF (1980) Adenosine receptor activation in human fibroblasts: nucleoside agonists and antagonists. *Can J Physiol Pharmacol* 58:673-691
 13. Cacciapuoti G, Oliva A, Zappia V (1978) Studies on phosphate-activated 5'-methylthioadenosine nucleosidase from human placenta. *Int J Biochem* 9:35-41
 14. Cantoni GL (1951) Activation of methionine for transmethylation. *J Biol Chem* 189:745-754
 15. Carrera CJ, Eddy RL, Shows TB, Carson DA (1984) Assignment of the gene for methylthioadenosine phosphorylase to human chromosome 9 by mouse-human somatic cell hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2665-2668
 16. Carson DA, Willis EH, Kamatani N (1983) Metabolism to methionine and growth stimulation by 5'-methylthioadenosine and 5'-methylthioinosine in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 112:391-397
 17. Carteni-Farina M, Della Ragione F, Ragosta G, Oliva A, Zappia V (1979) Studies on the metabolism of 5'-isobutylthioadenosine (SIBA): phosphorolytic cleavage by methylthioadenosine phosphorylase. *FEBS Lett* 104:266-270
 18. Chen ZH, Olopade OI, Savarese TM (1997) Expression of methylthioadenosine phosphorylase cDNA in p16-, MTAP- malignant cells: restoration of methylthioadenosine phosphorylase-dependent salvage pathways and alterations of sensitivity to inhibitors of purine de novo synthesis. *Mol Pharmacol* 52:903-911
 19. Chen ZH, Zhang H, Savarese TM (1996) Gene deletion chemoselectivity: codeletion of the genes for p16(INK4), methylthioadenosine phosphorylase, and the alpha- and beta-interferons in human pancreatic cell carcinoma lines and its implications for chemotherapy. *Cancer Res* 56:1083-1090

20. Christa L, Thuillier L, Munier A, Perignon JL (1984) Salvage of 5'-deoxy-methylthioadenosine into purines and methionine by lymphoid cells and inhibition of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 803:7-10
21. Cordon-Cardo C (1995) Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 147:545-560
22. Della Ragione F, Oliva A, Palumbo R, Russo GL, Gragnaniello V, Zappia V (1992) Deficiency of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase activity in malignancy. Absence of the protein in human enzyme-deficient cell lines. *Biochem J* 281 (Pt 2):533-538
23. Di Fiore PP, Grieco M, Pinto A, Attadia V, Porcelli M, Cacciapuoti G, Carteni-Farina M (1984) Inhibition of dimethyl sulfoxide-induced differentiation of Friend erythroleukemic cells by 5'-methylthioadenosine. *Cancer Res* 44:4096-4103
24. Diaz MO, Ziemin S, Le Beau MM, Pitha P, Smith SD, Chilcote RR, Rowley JD (1988) Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5259-5263
25. Diccianni MB, Batova A, Yu J, Vu T, Pullen J, Amylon M, Pollock BH, Yu AL (1997) Shortened survival after relapse in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients with p16/p15 deletions. *Leuk Res* 21:549-558
26. Dosik GM, Stewart D, Valdivieso M, Burgess MA, Bodey GP (1982) Phase I study of L-alanosine using a daily x 3 schedule. *Cancer Treat Rep* 66:73-76
27. Efferth T, Miyachi H, Drexler HG, Gebhart E (2002) Methylthioadenosine phosphorylase as target for chemoselective treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 28:47-56
28. Elson PJ, Kvols LK, Vogl SE, Glover DJ, Hahn RG, Trump DL, Carbone PP, Earle JD, Davis TE (1988) Phase II trials of 5-day vinblastine infusion (NSC 49842), L-alanosine (NSC 153353), acivicin (NSC 163501), and aminothiadiazole (NSC 4728) in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* 6:97-103
29. Erba E, Sen S, Sessa C, Vikhanskaya FL, D'Incalci M (1994) Mechanism of cytotoxicity of 5,10-dideazatetrahydrofolic acid in human ovarian carcinoma cells in vitro and modulation of the drug activity by folic or folinic acid. *Br J Cancer* 69:205-211

30. Ferro AJ, Vandenbark AA, MacDonald MR (1981) Inactivation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem Biophys Res Commun* 100:523-531
31. Ferro AJ, Wrobel NC, Nicolette JA (1979) 5-methylthioribose 1-phosphate: a product of partially purified, rat liver 5'-methylthioadenosine phosphorylase activity. *Biochim Biophys Acta* 570:65-73
32. Fitchen JH, Riscoe MK, Dana BW, Lawrence HJ, Ferro AJ (1986) Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in human leukemias and solid tumors. *Cancer Res* 46:5409-5412
33. Gale GR, Schmidt GB (1968) Mode of action of alanosine. *Biochem Pharmacol* 17:363-368
34. Garbers DL (1978) Demonstration of 5'-methylthioadenosine phosphorylase activity in various rat tissues. Some properties of the enzyme from rat lung. *Biochim Biophys Acta* 523:82-93
35. Goldsmith MA, Ohnuma T, Spigelman M, Greenspan EM, Holland JF (1983) Phase I study of L-alanosine (NSC 15353). *Cancer* 51:378-380
36. Graff JC, Plagemann PG (1976) Alanosine toxicity in Novikoff rat hepatoma cells due to inhibition of the conversion of inosine monophosphate to adenosine monophosphate. *Cancer Res* 36:1428-1440
37. Hellerbrand C, Muhlbauer M, Wallner S, Schuierer M, Behrmann I, Bataille F, Weiss T, Scholmerich J, Bosserhoff AK (2006) Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 27:64-72
38. Hunting D, Henderson JF (1978) Effects of 5'-deoxyadenosine on phosphoribosyl pyrophosphate and purine nucleotide synthesis in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 27:2163-2169
39. Illei PB, Ladanyi M, Rusch VW, Zakowski MF (2003) The use of CDKN2A deletion as a diagnostic marker for malignant mesothelioma in body cavity effusions. *Cancer* 99:51-56
40. Ishii M, Nakazawa K, Wada H, Nishioka J, Nakatani K, Yamada Y, Kamiyama S, Kusunoki M, Nobori T (2005) Methylthioadenosine phosphorylase gene is silenced by promoter hypermethylation in human lymphoma cell line DHL-9: another mechanism of enzyme deficiency. *Int J Oncol* 26:985-991

41. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54:6353-6358
42. Kamatani N, Carson DA (1980) Abnormal regulation of methylthioadenosine and polyamine metabolism in methylthioadenosine phosphorylase-deficient human leukemic cell lines. *Cancer Res* 40:4178-4182
43. Kamatani N, Carson DA (1981) Dependence of adenine production upon polyamine synthesis in cultured human lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta* 675:344-350
44. Kamatani N, Nelson-Rees WA, Carson DA (1981) Selective killing of human malignant cell lines deficient in methylthioadenosine phosphorylase, a purine metabolic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:1219-1223
45. Kamatani N, Yu AL, Carson DA (1982) Deficiency of methylthioadenosine phosphorylase in human leukemic cells in vivo. *Blood* 60:1387-1391
46. Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, et al. (1994) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 8:23-26
47. Kaneko K, Fujimori S, Kanbayashi T, Miyazawa Y, Kumakawa T, Fujii H, Miwa S, Kamatani N, Akaoka I (1990) Measurement of 5'-methylthioadenosine in patients with neoplasms. *Int J Cancer* 45:8-11
48. Kaneo K, Fujimori S, Kamatani N, Akaoka I (1984) 5'-methylthioadenosine in urine from normal subjects and cancer patients. *Biochem Biophys Acta* 802:169-174
49. Kano Y, Sakamoto S, Kasahara T, Kusumoto K, Hida K, Suda K, Ozawa K, Miura Y, Takaku F (1982) Methionine dependency of cell growth in normal and malignant hematopoietic cells. *Cancer Res* 42:3090-3092
50. Kindler HL, Burris HA, 3rd, Sandler AB, Oliff IA (2008) A phase II multicenter study of L-alanosine, a potent inhibitor of adenine biosynthesis, in patients with MTAP-deficient cancer. *Invest New Drugs*
51. Kohn KW, Jackman J, O'Connor PM (1994) Cell cycle control and cancer chemotherapy. *J Cell Biochem* 54:440-452

52. Kreis W, Baker A, Ryan V, Bertasso A (1980) Effect of nutritional and enzymatic methionine deprivation upon human normal and malignant cells in tissue culture. *Cancer Res* 40:634-641
53. Kubota M, Kajander EO, Carson DA (1985) Independent regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase in methylthioadenosine phosphorylase-deficient malignant murine lymphoblasts. *Cancer Res* 45:3567-3572
54. Kubota M, Kamatani N, Carson DA (1983) Biochemical genetic analysis of the role of methylthioadenosine phosphorylase in a murine lymphoid cell line. *J Biol Chem* 258:7288-7291
55. Li W, Su D, Mizobuchi H, Martin DS, Gu B, Gorlick R, Cole P, Bertino JR (2004) Status of methylthioadenosine phosphorylase and its impact on cellular response to L-alanosine and methylmercaptopurine riboside in human soft tissue sarcoma cells. *Oncol Res* 14:373-379
56. M'Soka T J, Nishioka J, Taga A, Kato K, Kawasaki H, Yamada Y, Yu A, Komada Y, Nobori T (2000) Detection of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) and p16 gene deletion in T cell acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR assay. *Leukemia* 14:935-940
57. Maher PA (1993) Inhibition of the tyrosine kinase activity of the fibroblast growth factor receptor by the methyltransferase inhibitor 5'-methylthioadenosine. *J Biol Chem* 268:4244-4249
58. Mandel JA, Dunham EK (1912) Preliminary note on a purine-hexose compound. *J Biol Chem* 11:85-86
59. Marce S, Balague O, Colomo L, Martinez A, Holler S, Villamor N, Bosch F, Ott G, Rosenwald A, Leoni L, Esteller M, Fraga MF, Montserrat E, Colomer D, Campo E (2006) Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12:3754-3761
60. Metcalf D (1989) The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339:27-30
61. Miller RL, Sabourin CL, Krenitsky TA (1987) Trypanosoma cruzi adenine nucleoside phosphorylase. Purification and substrate specificity. *Biochem Pharmacol* 36:553-560

62. Mori T, Yanagisawa A, Kato Y, Miura K, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y (1994) Accumulation of genetic alterations during esophageal carcinogenesis. *Hum Mol Genet* 3:1969-1971
63. Mueller JH (1923) *Biol Chem* 56:157-169
64. Munshi R, Clanachan AS, Baer HP (1988) 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine: a nucleoside which differentiates between adenosine receptor types. *Biochem Pharmacol* 37:2085-2089
65. Murthy YK, Thiemann JE, Coronelli C, Sensi P (1966) Alanosine, a new antiviral and antitumour agent isolated from a *Streptomyces*. *Nature* 211:1198-1199
66. Naslund M, Klasterska I, Kolman A, Ehrenberg L (1986) Mutagenic and comutagenic action of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine. *Mutat Res* 161:1-7
67. Nobori T, Karras JG, Della Ragione F, Waltz TA, Chen PP, Carson DA (1991) Absence of methylthioadenosine phosphorylase in human gliomas. *Cancer Res* 51:3193-3197
68. Nobori T, Szinai I, Amox D, Parker B, Olopade OI, Buchhagen DL, Carson DA (1993) Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in human non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 53:1098-1101
69. Nobori T, Takabayashi K, Tran P, Orvis L, Batova A, Yu AL, Carson DA (1996) Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6203-6208
70. Ogier G, Chantepie J, Deshayes C, Chantegrel B, Charlot C, Doutheau A, Quash G (1993) Contribution of 4-methylthio-2-oxobutanoate and its transaminase to the growth of methionine-dependent cells in culture. Effect of transaminase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 45:1631-1644
71. Okuda T, Shurtleff SA, Valentine MB, Raimondi SC, Head DR, Behm F, Curcio-Brint AM, Liu Q, Pui CH, Sherr CJ, et al. (1995) Frequent deletion of p16INK4a/MTS1 and p15INK4b/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85:2321-2330
72. Olopade OI, Buchhagen DL, Malik K, Sherman J, Nobori T, Bader S, Nau MM, Gazdar AF, Minna JD, Diaz MO (1993) Homozygous loss of the

- interferon genes defines the critical region on 9p that is deleted in lung cancers. *Cancer Res* 53:2410-2415
73. Olopade OI, Pomykala HM, Hagos F, Sveen LW, Espinosa R, 3rd, Dreyling MH, Gursky S, Stadler WM, Le Beau MM, Bohlander SK (1995) Construction of a 2.8-megabase yeast artificial chromosome contig and cloning of the human methylthioadenosine phosphorylase gene from the tumor suppressor region on 9p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6489-6493
74. Olsson RA, Khouri EM, Bedynek JL, Jr., McLean J (1979) Coronary vasoactivity of adenosine in the conscious dog. *Circ Res* 45:468-478
75. Pegg AE, Williams-Ashman HG (1969) Phosphate-stimulated breakdown of 5'-methylthioadenosine by rat ventral prostate. *Biochem J* 115:241-247
76. Plagemann PG, Wohlhueter RM (1983) 5'-Deoxyadenosine metabolism in various mammalian cell lines. *Biochem Pharmacol* 32:1433-1440
77. Riscoe MK, Ferro AJ (1984) 5-Methylthioribose. Its effects and function in mammalian cells. *J Biol Chem* 259:5465-5471
78. Riscoe MK, Schwamborn J, Ferro AJ, Olson KD, Fitch JH (1987) Inhibition of growth but not differentiation of normal and leukemic myeloid cells by methylthioadenosine. *Cancer Res* 47:3830-3834
79. Savarese TM, Chu SH, Chu MY, Parks RE, Jr. (1985) 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase--III. Role of the enzyme in the metabolism and action of 5'-halogenated adenosine analogs. *Biochem Pharmacol* 34:361-367
80. Savarese TM, Crabtree GW, Parks RE, Jr. (1981) 5'-Methylthioadenosine phosphorylase-L. Substrate activity of 5'-deoxyadenosine with the enzyme from Sarcoma 180 cells. *Biochem Pharmacol* 30:189-199
81. Savarese TM, Dexter DL, Parks RE, Jr. (1983a) 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase--II. Role of the enzyme in the metabolism and antineoplastic action of adenine-substituted analogs of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem Pharmacol* 32:1907-1916
82. Savarese TM, Ghoda LY, Dexter DL, Parks RE, Jr. (1983b) Conversion of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine and 5'-deoxy-5'-methylthioinosine to methionine in cultured human leukemic cells. *Cancer Res* 43:4699-4702
83. Schlenk F (1983) Methylthioadenosine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 54:195-265

84. Schlenk F, Smith RL (1953) The mechanism of adenine thiomethylriboside formation. *J Biol Chem* 204:27-34
85. Shafman TD, Sherman ML, Kufe DW (1984) Effect of 5'-methylthioadenosine on induction of murine erythroleukemia cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 124:172-177
86. Shimizu S, Abe T, Shiosaki S, Yamada H (1986). Catabolism of methylthioadenosine and S-adenosylhomocysteine in microorganisms. Paper presented at: Conference on polyamines in life sciences (Lake Yamanaka, Japan).
87. Shugart L, Tancer M, Moore J (1979) Methylthioadenosine nucleoside phosphorylase activity in *Drosophila melanogaster*. *Int J Biochem* 10:901-904
88. Siddiqi SM, Jacobson KA, Esker JL, Olah ME, Ji XD, Melman N, Tiwari KN, Secrist JA, 3rd, Schneller SW, Cristalli G, et al. (1995) Search for new purine- and ribose-modified adenosine analogues as selective agonists and antagonists at adenosine receptors. *J Med Chem* 38:1174-1188
89. Stoeckler JD, Li SY (1987) Influx of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine into HL-60 human leukemia cells and erythrocytes. *J Biol Chem* 262:9542-9546
90. Stone S, Dayananth P, Kamb A (1996) Reversible, p16-mediated cell cycle arrest as protection from chemotherapy. *Cancer Res* 56:3199-3202
91. Suzuki U, Odake S, Mori T (1924) *Biochem Z* 154:278-289
92. Tang B, Li YN, Kruger WD (2000) Defects in methylthioadenosine phosphorylase are associated with but not responsible for methionine-dependent tumor cell growth. *Cancer Res* 60:5543-5547
93. Tisdale MJ (1983) Methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine by tumour cells. *Biochem Pharmacol* 32:2915-2920
94. Toohey JI (1978) Methylthioadenosine nucleoside phosphorylase deficiency in methylthio-dependent cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 83:27-35
95. Traweek ST, Riscoe MK, Ferro AJ, Brazier RM, Magenis RE, Fitch JH (1988) Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in acute leukemia: pathologic, cytogenetic, and clinical features. *Blood* 71:1568-1573
96. Tyagi AK, Cooney DA (1980) Identification of the antimetabolite of L-alanosine, L-alanosyl-5-amino-4-imidazolecarboxylic acid ribonucleotide, in

- tumors and assessment of its inhibition of adenylosuccinate synthetase. *Cancer Res* 40:4390-4397
97. Tyagi AK, Cooney DA (1984) Biochemical pharmacology, metabolism, and mechanism of action of L-alanosine, a novel, natural antitumor agent. *Adv Pharmacol Chemother* 20:69-121
98. Weick JK, Trantum BL, Morrison FS (1983) The treatment of acute leukemia with continuous infusion L-Alanosine. *Invest New Drugs* 1:249-251
99. Williams-Ashman HG, Seidenfeld J, Galletti P (1982a) Trend in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem Pharmacol* 31:277-288
100. Williams-Ashman HG, Seidenfeld J, Galletti P (1982b) Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem Pharmacol* 31:277-288
101. Wolford RW, MacDonald MR, Zehfus B, Rogers TJ, Ferro AJ (1981) Effect of 5'-methylthioadenosine and its analogues on murine lymphoid cell proliferation. *Cancer Res* 41:3035-3039
102. Wolford RW, Riscoe MK, Johnson L, Ferro AJ, Fitch JH (1984a) Effect of 5'-methylthioadenosine (a naturally occurring nucleoside) on murine hematopoiesis. *Exp Hematol* 12:867-871
103. Wolford RW, Riscoe MK, Johnson L, Ferro AJ, Fitch JH (1984b) Effect of 5'-methylthioadenosine (a naturally occurring nucleoside) on murine hematopoiesis. *Exp Hematol* 12:867-871
104. Yamanaka H, Kubota M, Carson DA (1987) Synergistic inhibition of polyamine synthesis and growth by difluoromethylornithine plus methylthioadenosine in methylthioadenosine phosphorylase-deficient murine lymphoma cells. *Cancer Res* 47:1771-1774
105. Yu J, Batova A, Shao L, Carrera CJ, Yu AL (1997) Presence of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) in hematopoietic stem/progenitor cells: its therapeutic implication for MTAP (-) malignancies. *Clin Cancer Res* 3:433-438
106. Zappia V, Oliva A, Cacciapuoti G, Galletti P, Mignucci G, Carteni-Farina M (1978) Substrate specificity of 5'-methylthioadenosine phosphorylase from human prostate. *Biochem J* 175:1043-1050

107. Zhang H, Chen ZH, Savarese TM (1996) Codeletion of the genes for p16INK4, methylthioadenosine phosphorylase, interferon-alpha1, interferon-beta1, and other 9p21 markers in human malignant cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 86:22-28

7 Danksagung und Publikation

Herrn Dr. med. J. Schwamborn, Oberarzt der Inneren Medizin I, danke ich für die Überlassung des Themas der hier vorliegenden Arbeit, für seine unermüdliche Unterstützung und die Möglichkeit diese Dissertation im Labor der Inneren Medizin I durchführen zu können.

Bedanken möchte ich mich besonders auch bei Herrn Prof. Dr. med. C. Renner, der mich als Doktorand übernahm und mir so die Möglichkeit gab, diese Dissertation fertig zu stellen.

Weiterhin gilt mein Dank den medizinisch technischen Assistentinnen des hämatologisch-onkologischen Labors der Inneren Medizin I, insbesondere Frau S. Bamberger für ihre kompetente und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und allen denjenigen, die die Fertigstellung dieser Dissertation erst ermöglichten.

Die Arbeit wurde wie folgt publiziert:

Schwamborn, J.S., **Bergener, P.**, Dreyer, N., Schöndorf, S., und Riscoe, M.K. (1995) Methylthioadenosine phosphorylase „deficiency“ of human hemopoietic progenitor cells. Acta Haematol. (Basel), 93: 131.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Pia Ingrid Hennes, geb. Bergener
Adresse:	Preußenstraße 19 66424 Homburg
Geburtstag:	09.03.1970
Geburtsort:	Pforzheim
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schul Ausbildung

1976 – 1980	Grundschule in Pforzheim
1980 – 1989	Gymnasium in Pforzheim

Studium

Herbst 1989 – Frühjahr 1996	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
30.04.1996	3. Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

01.08.1996 – 30.09.1996	Ärztin im Praktikum, St. Josefs Krankenhaus, Losheim, chirurgische Abteilung
01.10.1996 – 31.01.1998	Ärztin im Praktikum, Universitätskinderklinik, Homburg/Saar
01.02.1998 – andauernd	Assistenzärztin, Universitätskinderklinik, Homburg/Saar

Lebenslauf

Februar 1998	Beginn der Betreuung der Diabetiker im ambulanten und stationären Bereich
2001/2002	11 monatige Elternzeit mit Teilzeitbeschäftigung in der Diabetes-Ambulanz
02.07.2003	Anerkennung als Fachärztin für Kinderheilkunde
November 2003	Beginn in der Abteilung für pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie an der Universitätskinderklinik des Saarlandes
2005/2006	8 monatige Elternzeit
seit 15.01.2006	Teilzeit in der Abteilung für pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie an der Universitätskinderklinik des Saarlandes
18.06.2008	Anerkennung zum Führen der Zusatzbezeichnung Kinder-Endokrinologie und Kinder-Diabetologie

Homburg, den 10.09.2008

Pia Hennes